

Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков

**МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА
МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ
В КУЛЬТУРЕ**

**Севастополь,
2017**

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ МОРСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ИМЕНИ А.О. КОВАЛЕВСКОГО

Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков

**МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ**

Белгород
ООО «КОНСТАНТА»
2017

УДК 519.876.5:582.26/.27
ББК 22.162:28.591
Т 66

Рецензенты: академик РАН, д-р биол. наук., проф. В.Н. Егоров
д-р биол. наук В.А. Силкин

Тренкеншу Р. П., Лелеков А.С.

Т 66 Моделирование роста микроводорослей в культуре. – Белгород :
ООО «КОНСТАНТА», 2017. – 152 с.
ISBN 978-5-906952-28-8

В монографии представлены результаты теоретических и экспериментальных исследований роста культур микроводорослей. Монография основана на серии статей под общим названием «Простейшие модели роста микроводорослей». Уделено внимание количественным аспектам роста микроводорослей в накопительной, квазинепрерывной и непрерывной культуре. Рассмотрены механизмы ограничения роста микроводорослей различными факторами среды.

Монография представляет интерес для специалистов по исследованию роста микроводорослей, а также альгобиотехнологов. Также будет полезна студентам и аспирантам, обучающимся по биологическим и биофизическим специальностям.

УДК 519.876.5:582.26/.27
ББК 22.162:28.591
Т 66

Trenkenshu R. P., Lelekov A.S.

Modeling growth of microalgae in culture. – Belgorod :
ООО «CONSTANTA», 2017. – 152 p.
ISBN 978-5-906952-28-8

The monograph presents the results of theoretical and experimental studies of the microalgae growth in cultures. The monograph is based on a series of articles under the title «The simplest models of microalgae growth». Attention is paid to quantitative aspects of the growth of microalgae to batch, quasi-continuous and continuous culture. The mechanisms limiting the microalgae growth to different environmental factors is discussed.

The monograph is of interest for specialists in the study of the microalgae growth, as well as algaetechnologists. Will also be useful to undergraduate and graduate students enrolled in biological and bio-physical disciplines.

Утверждено к печати Учёным советом
ФГБУН «Институт морских биологических исследований
имени А.О. Ковалевского РАН» (протокол № 1 от 17 февраля 2017 г.)

©Тренкеншу Р.П. (текст), 2017
©Лелеков А.С. (текст, макет), 2017

ISBN 978-5-906952-28-8

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. Моделирование динамики плотности накопительной культуры	9
1.1. Логистическая функция	11
1.2. Динамическая модель накопительной культуры с учётом потерь биомассы	15
ГЛАВА 2. Моделирование накопительной культуры микроводорослей в различных фазах роста	24
2.1. Периодическая (накопительная) культура.....	27
2.2. Определение границ фаз роста	35
ГЛАВА 3. Моделирование роста квазинепрерывной культуры микроводорослей	39
3.1. Управляемая культура микроводорослей	39
3.2. Культура с заданной скоростью разбавления.....	41
3.3. Хемостат.....	43
3.4. Культура с заданной плотностью. Плотностат	50
3.5. Моделирование содержания биохимических составляющих в клетках микроводорослей на протоке	54
ГЛАВА 4. Модель потребления элементов минерального питания микроводорослями	61
4.1. Общий случай субстратного обмена	62
4.2. Расчёт величины потребности для различных фаз роста.....	64
4.3. Расчёт величины потребности для непрерывной культуры.....	71
Глава 5. Моделирование скорости энергообмена в культурах микроводорослей	75
5.1. Скорость энергообмена	75
5.2. Предельные скорости роста культур микроводорослей.....	80
ГЛАВА 6 Моделирование индивидуального роста клеток микроводорослей	85
6.1. Индивидуальный рост клеток в плотностате	85
6.2. Индивидуальный рост клеток в хемостате	90

ГЛАВА 7 Модель динамики пигментов в экспоненциальной фазе роста культуры микроводорослей	94
7.1. Моделирование процессов синтеза, фотодеструкции и восстановления пигментов при экспоненциальном росте культуры микроводорослей	96
7.2. Описание экспериментальных данных	107
 ГЛАВА 8 Темновые процессы в культурах микроводорослей	113
8.1. Динамика интенсивности дыхания в темноте	115
8.2. Темновая потеря биомассы	122
 ГЛАВА 9 Культура микроводорослей как модельный объект в гидроэкологии.....	125
9.1. Микроэволюция.....	131
9.2. Динамика популяций	133
 Приложение Математическая модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей	139
 ЛИТЕРАТУРА	145

ВВЕДЕНИЕ

Количественным аспектам роста организмов посвящено множество публикаций [Абросов, Ковров, Черепанов, 1982; Белянин, 1984; Вальтер, Лампрехт, 1976; Герасин, Козлов, 2008; Количественные ..., 1975; Логофет, Белова, 2007; Перт, 1978; Прокофьев, Зотина, Зотин, 1982; Скалецкая, Фрисман, Шапиро, 1979; Шапиро, Луппов, 1983; Bergter, 1983]. В своих работах исследователи используют различные подходы, стремясь либо выявить общие закономерности, присущие всем живым организмам, либо учесть специфические черты отдельных групп организмов [Заика, 1973; Зотин, 1974]. Хотя в этом направлении сделаны немалые успехи, вопрос количественного описания процессов роста остаётся по-прежнему открытым.

Рост любых организмов является сложным и многоступенчатым процессом, включающим тысячи биохимических реакций, при моделировании вклад каждой реакции учесть не представляется возможным. Поэтому в теоретических и практических исследованиях ограничиваются лишь небольшим числом параметров, которые, по мнению исследователя, наиболее полно характеризуют моделируемый объект или явление. Например, при моделировании роста микроорганизмов в культуре среди множества параметров наиболее широко используются такие количественные характеристики как плотность культуры, скорость роста, удельная скорость, экономический коэффициент и пр.

При моделировании процессов взаимодействия популяции с окружающей средой в экологии и биотехнологии широко используют метод накопительных и проточных культур [Кокова, 1982; Лежнев, Пакратов, Кошевой, 1974; Перт, 1978; Muggay, 2002], причём особый интерес представляют культуры микроорганизмов на жидких средах. Главным достоинством культур микроорганизмов как модельного объекта являются высокая скорость деления клеток, малые размеры, кроме того, появляется возможность воспроизводимости экспериментальных результатов за малые промежутки времени.

При исследовании динамики роста популяции микроорганизмов посредством математического моделирования особый интерес представляет построение динамических математических моделей, позволяющих объяснить и прогнозировать рост культур во всех фазах своего развития [Бейли, Оллис, 1989]. Как и при моделировании любых биологических процессов, при построении динамических моделей роста популяции используются два взаимодополняющих подхода: первый – параметризация процесса путём введения некоторых эмпирических связей, второй – построение моделей на основе известных представлений о физиологических механизмах роста популяции и размножения организмов. В первом случае основным требованием является адекватное описание (с заданной точностью) экспериментальных данных, при этом такие модели имеют узкий круг

применимости. Следует отметить, что такие модели имеют небольшую прогностическую ценность, но этап эмпирического моделирования исключительно важен как формализация подхода в целом. Введение новых понятий и определений на этом этапе служит основой для дальнейшего, более детального исследования процессов роста. Во втором случае, напротив, модели отражают некоторые закономерности, присущие объекту исследования, при этом входящим параметрам моделей стремятся придать определённый биологический смысл. С теоретической и практической точки зрения наибольший интерес представляет второй класс моделей (качественные модели), поскольку они дают новые фундаментальные представления и знания о процессах роста, а также обладают большей прогностической ценностью.

При построении качественных моделей в значительной мере упрощает процесс моделирования использование ранее сформулированных общебиологических принципов. К таковым относятся: конструктивный принцип Ж. Либиха [Liebig, 1847]; принцип Ф. Блэкмана о лимитирующих факторах [Blackman, 1905]; принцип узкого места метаболизма, сформулированный Ж. Моно [Чернавский, Иерусалимский, 1965; Monod, 1949]. Также для упрощения моделей в математической биофизике популяций обычно используется ряд допущений. К примеру: 1) в большинстве работ предполагается неизменность внешних условий; 2) число особей в популяции считается непрерывной величиной и флуктуациями численности пренебрегают, изучая динамику только средних значений; 3) при исследовании микробных популяций в культуре делается допущение об идеальном перемешивании; 4) часто используется предположение о неизменности возрастной структуры популяции и т. д. Опираясь на данные допущения и используя вышеупомянутые принципы, удаётся избежать громоздких математических описаний и модели становятся доступны широкому кругу исследователей различных специальностей.

Накопленные к настоящему моменту знания о росте и фотосинтезе микроводорослей, особенно в области управляемого фотобиосинтеза, вместе с уже устоявшимися представлениями и принципами биологии и биофизики, позволяют вплотную подойти к решению проблем, связанных с созданием теории роста микроводорослей. По крайней мере, это близко к реальности на популяционном уровне изучения закономерностей роста в зависимости от видоспецифических свойств микроводорослей и внешних условий, в которых находятся клетки.

Рост микроводорослей можно рассматривать как количественное изменение числа клеток в популяции (для ограниченного объёма – концентрации клеток или плотности культуры). Такое, более узкое понимание роста, значительно облегчает создание теории. В физическом смысле рост представляет собой неравновесный процесс, поэтому, вполне оправданно можно использовать термин кинетика роста микроводорослей, подразумевая под этим термином, как теорию роста, так и конкретные зависимости ростовых характеристик от того или иного фактора внешней среды.

Один из главных принципов, определяющих подход к разработке теоретических основ роста, является положение о том, что синтез органического вещества (а, соответственно, и рост организма) происходит за счёт биохимических реакций с участием ферментов, каждый из которых контролируется отдельным геном. Это положение впервые четко сформулировано Дж. Бидлом и Э. Татумом [Beadle, Tatum, 1941] в виде гипотезы, которая считается общепризнанной. Из схемы «один ген – один фермент – одна биохимическая реакция» вытекает, что кинетическая теория роста микроводорослей должна обязательно включать элементы теории управления и кинетики ферментативного катализа.

Другой основной принцип, широко используемый в биофизике, принцип простоты. Применительно к ферментативной кинетике этот принцип формулируется как определяющее звено в цепи ферментативных реакций [Романовский, Степанова, Чернавский, 1975]. По отношению к субстратзависимому росту организмов принцип простоты эквивалентен принципу лимитирующих факторов (принцип Либиха) [Liebig, 1847]. В микробиологии Моно [Monod, 1949] ввел понятие «принцип узкого места» метаболизма. Этот принцип позволяет выделить главный фактор, определяющий рост микроводорослей в целом. Вместе с дополнительным принципом смены лимитирующих факторов [Liebig, 1847; Blackman, 1905], принцип узкого места дает возможность не только формально описать рост микроводорослей (в тех или иных внешних условиях среды), но и позволяет использовать редукцию системы уравнений, т. е. сделать это с помощью минимального числа относительно простых уравнений.

Разработка кинетической теории роста микроводорослей и появляющаяся при этом возможность математического моделирования очень важна не только с точки зрения практики, но и возможностей приложения в научных исследованиях. Количество исследований роста и биохимического состава микроводорослей в культуре огромно и составляет тысячи опубликованных экспериментальных работ. Большинство опытов проведено с периодической культурой микроводорослей и практически без использования математического анализа данных с помощью даже простейших моделей роста. В лучшем случае анализ сводится к определению удельной скорости роста через логарифмирование концентрации клеток. Хотя такое представление об измерении удельной скорости роста применимо в ограниченном диапазоне концентраций клеток при соблюдении некоторых условий, которые в большинстве такого рода работ не соблюдаются.

Сложившаяся традиция работы с периодической культурой без серьезного анализа полученных данных связана, в первую очередь, с простотой и небольшой трудоемкостью проведения таких экспериментов. Проблема заключается в том, что рост микроводорослей в периодической культуре представляет собой неравновесный динамический процесс, а исследования проводятся, как правило, специалистами без соответствующей математи-

ческой подготовки и им трудно анализировать такие процессы. Еще одной проблемой является отсутствие простой, но общепринятой модели субстратзависимого роста микроводорослей, хотя предложено их большое количество, особенно моделей светозависимого роста.

Несмотря на относительно небольшое число экспериментальных работ с непрерывными культурами микроводорослей, основные успехи в области изучения роста микроводорослей достигнуты именно при работе в таких режимах выращивания. Особенностью непрерывных культур является возможность достижения динамически равновесного состояния. В этом случае стабилизируются все характеристики культуры, строго контролируется воспроизводимость результатов, любой анализ производится без вмешательства в процессы роста. Здесь появляется возможность определения удельной скорости роста с любой заданной точностью, а выполняющееся условие: все удельные скорости равны и равны удельной скорости потока, – позволяет находить зависимости биохимического состава клеток от условий внешней среды.

Более сложная ситуация наблюдается в периодической культуре микроводорослей, когда вмешательство в процессы роста нежелательно, но без отбора проб невозможен анализ состояния культуры и приходится искать компромисс, который каждый исследователь находит произвольно. Это приводит к ограничению сопоставимости результатов. Однако, есть возможность избежать противоречия, применив режим многоступенчатого культивирования, например, используя многоступенчатый хемостат. В этом случае можно с заданной точностью промоделировать всю накопительную кривую роста микроводорослей. Несмотря на небольшие технические трудности, такие работы практически отсутствуют. Причина здесь также кроется в отсутствии пусть простейших, но общепринятых модельных представлений о росте микроводорослей в культуре.

Основная цель настоящей работы – разработка подходов и модельных представлений, которые могут быть положены в основу кинетической теории роста микроводорослей в культуре. При этом математическая строгость такой теории должна быть дополнена конкретными примерами возможности упрощения теории для её практического использования в анализе экспериментальных данных и построения прогностических моделей роста микроводорослей при заданных начальных условиях культуры и внешней среды. Достижение такой цели невозможно без выделения из множества факторов среды, которые влияют на рост микроводорослей, ведущего, который оказывает самое существенное влияние на рост. Для микроводорослей (как и для любых растений) характерно четкое разграничение механизмов световых и темновых стадий метаболизма, которые в совокупности определяют рост клеток. Соответственно, кинетическая теория роста микроводорослей должна включать модельные представления о механизме этих стадий и их возможном взаимодействии.

ГЛАВА 1

Моделирование динамики плотности накопительной культуры

Рассмотрим группу качественных моделей накопительной культуры микроорганизмов, основанных на вышеуказанных принципах и допущениях. Важным является тот факт, что модели могут быть выражены в элементарных функциях, причём параметры моделей имеют строгий биологический смысл.

Фундаментальным признаком живых систем является способность к самовоспроизведению. Живые организмы способны к увеличению своей биомассы (размножению) только при определённых физиологических и физико-химических условиях. Количественной характеристикой воспроизводства популяции микроорганизмов является скорость роста числа клеток или продуктивность. Поскольку в процессе деления живые клетки способны к производству новых клеток, величина скорости роста числа клеток будет прямопропорциональна их количеству, а продуктивность – биомассе:

$$\frac{dN}{dt} \sim N, \quad \frac{dB}{dt} \sim B,$$

где N – число клеток, B – биомасса.

Опираясь на это положение, можно получить закон экспоненциального роста популяции, который впервые сформулировал Т. Мальтус в работе [Malthus, 1798]. Математическая запись этого закона имеет вид:

$$B(t) = B_0 \cdot e^{\mu t}, \quad (1.1)$$

где B_0 – биомасса в начальный момент времени $t = 0$; μ – постоянный коэффициент, биологический смысл которого отражает меру самовоспроизводства популяции. Этот коэффициент является удобным критерием сравнения скоростей роста культуры микроорганизмов разной плотности в различных условиях. В литературе этот коэффициент называется относительной или удельной скоростью роста [Blackman, 1919].

Запись закона Мальтуса в экспоненциальной форме (1.1) является наиболее распространённой. Однако для тех случаев, когда популяцию рассматривают как совокупность отдельных клеток, которые синхронно делятся, тогда зависимость численности клеток от времени записывается в показательной форме [Уильямсон, 1975]:

$$N(t) = N_0 \cdot a^t,$$

где a – число дочерних клеток, на которое делится материнская клетка.

Из выражения (1.1) следует, что при $\mu = const$ динамика плотности культуры подчинена закону экспоненциального роста. В таких случаях принято считать, что рост популяции неограничен внешними условиями, ограничение скорости роста проявляется только на уровне организации узкого места метаболизма потоком энергетического субстрата, необходимого для биосинтеза [Тренкеншу, 2005]. Например, у фототрофов величина потока макроэргических соединений (АТФ) обусловлена световыми условиями, у гетеротрофов – потоком окисляемого или восстанавливаемого субстрата, который используется для синтеза макроэргов. Следовательно, при изменении внешних условий, после процессов адаптации, величина удельной скорости роста будет принимать новое значение.

Постоянство удельной скорости роста подразумевает постоянство всех относительных скоростей синтеза клеточных компонентов. В таком случае в экспоненциальной фазе роста биохимический состав биомассы остается неизменным. Следует отметить, что на начальных этапах накопительной культуры клетки адаптируются к новым условиям, т. е. происходит изменение биохимического состава. По определению, собственно экспоненциальный рост начинается с момента окончания адаптации клеток к новым условиям. На практике, в связи с наличием ошибки измерения плотности культуры, может наблюдаться так называемый «кажущийся» экспоненциальный рост, когда наблюдаемая удельная скорость роста постоянна, а биохимический состав клеток изменяется. Экспоненциальный рост наблюдается на небольших временных интервалах, либо вообще отсутствует [Работнова, 1972]. Во многих работах несоответствие экспериментальных данных экспоненциальному росту авторы относят к ошибкам измерений и для повышения точности описания вводят поправочные коэффициенты. Однако в большинстве случаев введение поправочных коэффициентов является чисто математическим приёмом и не отражает биологической сути процессов роста культуры [Вальтер, Лампрехт, 1976].

Основываясь на представлениях о смене лимитирующих факторов и понятии организации узкого места метаболизма [Тренкеншу, 2005], можно утверждать, что отклонение от экспоненциального роста обусловлено ограничением скорости роста внешними условиями. Если накопительная культура есть закрытая система [Геворгиз, Лелеков, Король, 2013] то лимитирующим фактором является один из биогенных элементов, концентрация которого уменьшается с накоплением биомассы. Если накопительная культура есть непропорционально-проточная, открытая система, то скорость роста определяется относительной скоростью потока лимитирующего биогенного элемента, например, количество CO_2 , подаваемого в культуру на единицу биомассы в единицу времени. Для фототрофов также в качестве лимитирующего субстрата может выступать световой поток – с ростом плотности культуры величина средней пространственной облученности будет уменьшаться [Белянин, Сидько, Тренкеншу, 1980].

1.1. Логистическая функция

Рассмотрим случай лимитирования роста накопительной культуры в закрытой системе одним из биогенных элементов питательной среды. Известно, что для таких условий кривая роста культуры имеет S-образную форму и описывается логистической функцией [Pearl, Reed, 1923]. Логистическая функция может быть получена из предположения о пропорциональности величины продуктивности произведению текущей плотности B культуры и концентрации лимитирующего субстрата в околочлеточной среде S [Ковров, 1966]:

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot B \cdot S, \quad (1.2)$$

где k – константа пропорциональности, которая по сути является произведением энергозависимого коэффициента k_i и некоторого коэффициента связи k_s текущей концентрации субстрата и скорости роста. Следует отметить, что k_i для фототрофов является светозависимой величиной, поэтому при изменении световых условий константа k также может изменяться.

Выражение (1.2) является дифференциальной формой записи динамики субстратзависимого роста популяции в закрытой системе. Чтобы его проинтегрировать необходимо ввести связь текущего значения биомассы и концентрации субстрата. В работе Либиха [Liebig, 1847] впервые введено представление о связи биомассы и количества поглощённого субстрата, которое в последствии было сформулировано как «конструктивный принцип Либиха». Количественно эту связь выражают в виде экономического коэффициента прироста биомассы [Перт, 1978].

Величина отношения потреблённого клетками субстрата к приросту биомассы в литературе получила название потребности Y_s биомассы в субстрате [Гуревич, 1984].

$$Y_s = -\frac{S - S_0}{B - B_0}; \quad S = S_0 - Y_s(B - B_0).$$

Экономический коэффициент является обратной величиной потребности в субстрате. С ростом плотности культуры за пределами экспоненциальной фазы роста Y_s является переменной величиной, которая зависит от потока лимитирующего субстрата в узкое место метаболизма, структурной организации клетки и пр. Для непрерывной культуры в стационарных условиях такая зависимость получена экспериментальным путём [Droop, 1970]. Для накопительной культуры зависимость величины потребности от концентрации лимитирующего субстрата неизвестна. Для небольших промежутков времени величину Y_s можно считать неизменной. Тогда запишем:

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot B \cdot (S_0 + Y_s \cdot B_0 - Y_s \cdot B).$$

Решение данного уравнения с начальными условиями $t = 0$, $B = B_0$ имеет вид:

$$B = \frac{S_0 + Y_s \cdot B_0}{Y_s + \frac{S_0}{B_0} \cdot e^{-(S_0 + Y_s \cdot B_0) \cdot k \cdot t}}. \quad (1.3)$$

В отличие от закона экспоненциального роста, последнее выражение имеет предел: при $t \rightarrow \infty$ плотность культуры достигает своего максимального значения B_m .

$$B_m = \frac{S_0 + Y_s \cdot B_0}{Y_s} = \frac{S_0}{Y_s} + B_0.$$

Подставляя значение B_m в (1.3), получаем кривую, носящую название «логистической функции» Ферхюльста-Пирля [Verhulst, 1845].

$$B = \frac{Y_s \cdot B_m}{Y_s + \frac{S_0}{B_0} \cdot e^{-Y_s \cdot B_m \cdot k \cdot t}} = \frac{B_m}{1 + \frac{S_0}{Y_s \cdot B_0} \cdot e^{-Y_s \cdot B_m \cdot k \cdot t}}. \quad (1.4)$$

Можно показать, что логистическая функция (1.4) имеет точку перегиба, в которой продуктивность максимальна. Действительно, если продифференцировать уравнение (1.4), то значение третьей (нечётной) производной не равно нулю: $B'''(t_p) = -2k \cdot Y_s \neq 0$. Кроме того, важным является то, что в момент времени t_p в этой точке плотность культуры $B(t_p)$ достигает половины максимального значения:

$$t_p = \frac{\ln\left(\frac{S_0}{Y_s B_0}\right)}{Y_s \cdot B_m \cdot k}, \quad B(t_p) = \frac{B_m}{2}.$$

Функция (1.4) характеризуется симметричностью относительно точки перегиба. Однако на практике часто наблюдается несимметричность накопительной кривой (см. рис. 1.1), что в некоторых случаях можно объяснить соотношением значений начальной концентрации субстрата и начальной плотности культуры. Например, если коэффициент, стоящий перед экспонентой в выражении (1.4), меньше единицы, то накопительная кривая не будет иметь точки перегиба [Ризниченко, 2003]. Следовательно при таких условиях культура микроорганизмов будет находиться в фазе замедления роста.

В фазе замедления роста плотность культуры близка к своему максимальному значению, а концентрация субстрата становится настолько мала, что в некоторый момент времени продуктивность становится независимой от плотности культуры:

$$\frac{dB}{dt} = k_s \cdot S,$$

$$\frac{dB}{dt} = k_s \cdot (S_n - Y_S \cdot (B - B_n)) = k_s \cdot (S_n - Y_S \cdot B + Y_S \cdot B_n),$$

где k_s – константа пропорциональности; S_n , B_n – начальные значения концентрации субстрата и биомассы в среде в момент времени, когда скорость роста становится не пропорциональна плотности культуры.

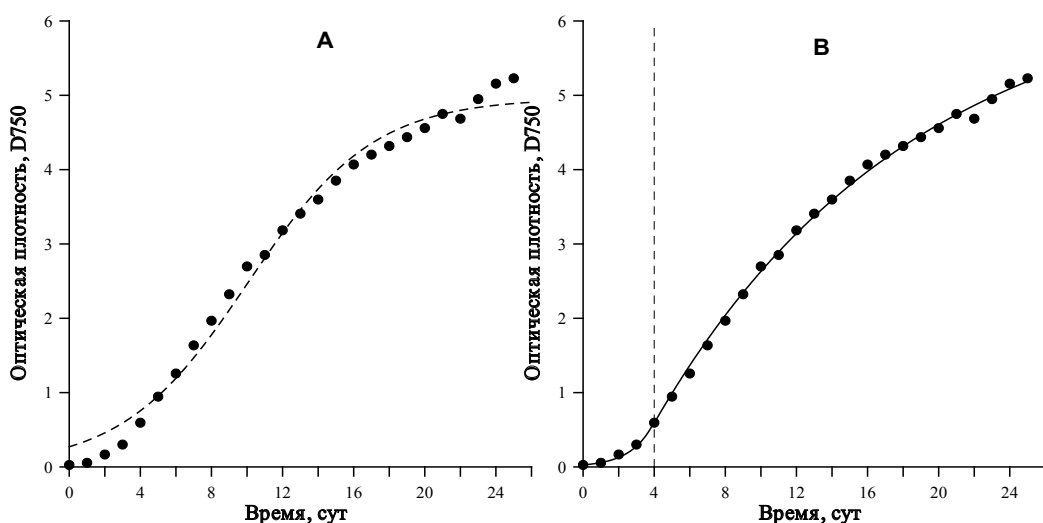


Рисунок 1.1. Ассиметричная накопительная кривая роста спирулины. А – аппроксимация экспериментальных данных логистической функцией (1.4). В – аппроксимация экспериментальных данных экспонентой (1.1) и (1.5). Пунктирная линия указывает на точку перегиба и сопряжения экспоненты с выражением (1.5)

Figure 1.1. Asymmetric spirulina batch curve. А – approximation of experimental data by logistic function (1.4). В – approximation of the experimental data by exponential expression (1.1) and (1.5). The dotted line indicates the point of inflection and pairing of exponent (1.1) and expression (1.5)

Впервые экспериментально пропорциональность продуктивности концентрации субстрата подтверждена при исследовании фотосинтеза в работе Блэкмана [Blackman, 1905]. Следует отметить, что в данном случае аналогично конструктивному принципу Либиха скорость определяется потоком лимитирующего субстрата, т. е. находящегося в минимуме.

Решение последнего уравнения имеет вид:

$$B = B_i + \frac{S_i}{Y_S} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot Y_S \cdot (t - t_i)}). \quad (1.5)$$

При $t \rightarrow \infty$, плотность культуры стремится к своему максимальному значению $B \rightarrow B_m$:

$$B_m = B_i + \frac{S_i}{Y_s}.$$

Выражение для B_m аналогично выражению для максимальной плотности при анализе логистической кривой. Анализ выражения (1.5) показывает, что данная функция монотонно возрастает, асимптотически приближаясь к B_m , и в отличие от логистической кривой не имеет точки перегиба.

В итоге для описания динамики биомассы в накопительной культуре в закрытой системе может использоваться несколько моделей. В данной работе предложены модели, которые применимы для описания только части накопительной кривой (одной из фаз роста) в закрытой системе. Даже логистическая функция, которую формально можно использовать для описания всей накопительной кривой в закрытой системе (см. рис. 1.2А), в связи с непостоянством биохимического состава клеток не применима для описания всей S-образной кривой, поскольку при выводе уравнения (1.4) сделано допущение о постоянстве величины Y_s потребности клеток в субстрате, т. е. неизменности биохимического состава клеток. Но такое допущение верно только для условий нелимитированного роста.

Опираясь на понятия биомассы, концентрацией лимитирующего субстрата и его потребностью для закрытой системы, по-видимому, невозможно предложить модель, посредством которой можно описать всю накопительную кривую. Для построения такой модели необходимо введение новых параметров, которые учитывают современные представления об организации узкого места метаболизма, о потоках лимитирующего субстрата в узкое место метаболизма и т. д. [Тренкеншу, 2005].

На современном этапе теория субстратзависимого роста микроорганизмов в культуре достаточно глубоко разработана для стационарных условий в проточной культуре [Левич, 2000]. Для условий накопительной культуры в закрытой системе модели практически отсутствуют, что связано с трудностями математического описания динамических процессов и получением решений, выраженных в элементарных функциях. В данной работе сделана попытка описания накопительной кривой моделями, которые основаны на простейших представлениях. Хотя полученные модели не позволяют описать всю накопительную кривую, при её разбиении на участки – фазы роста – применение указанных моделей допустимо с точностью, определяемой ошибкой измерения переменных.

Недостатком существующих динамических моделей, в том числе приведённых в данной работе, является предположение о неизменности биохимического состава клеток во всех фазах роста накопительной культуры. Экспериментально показано, что в связи с лимитированием роста субстратом в фазе замедления потребность может изменяться,

причём эти изменения обусловлены, изменением биохимического состава клеток [Gatenby, Orcutt, Kreeger et al., 2003]. Поэтому для повышения точности описания необходимо в приведённых моделях учесть зависимость между потребностью и лимитирующим субстратом. Такую зависимость для заданных внешних условий можно получить либо экспериментально, либо теоретически путём введения новых понятий о внутриклеточном содержании субстрата, о ёмкости субстратного депо и т. д. [Тренкеншу, 2005; Droop, 1970]. Приведённые в данном разделе модели не учитывают снижение скорости роста за счёт потерь биомассы – совокупности процессов, приводящих к уменьшению плотности культуры. В частности, потери биомассы могут происходить из-за гибели клеток, потерь клеточных структур при делении клеток, процессов темнового дыхания, выделения экзометаболитов и т. д.

1.2. Динамическая модель накопительной культуры с учётом потерь биомассы

Довольно ограниченное число теоретических работ при моделировании динамики роста накопительной культуры связано с тем, что решения дифференциальных уравнений для нестационарного процесса трудно представить в элементарных аналитических функциях.

Предположим, что скорость роста культуры определяется разностью скоростей биосинтеза и потерь биомассы. Запишем зависимость удельной скорости роста культуры μ от концентрации лимитирующего субстрата в среде S в виде ломанной:

$$\mu(S) = \begin{cases} \mu_0 - \mu_r, S \geq K \\ \frac{\mu_0}{K} \cdot S - \mu_r, S < K \end{cases} \quad (1.6)$$

где μ_0 – максимальная удельная скорость синтеза биомассы, μ_r – удельная скорость потерь биомассы, K – константа насыщения.

Из (1.6) следует, что при постоянстве удельных скоростей синтеза и потерь, а также $S \geq K$ культура будет расти согласно экспоненциальному закону Мальтуса. Экспериментально доказано, что такой рост может продолжаться лишь ограниченный промежуток времени, который получил название «фазы экспоненциального роста». По её окончании, культура перейдёт в фазу замедления роста, при этом скорость роста будет зависеть от концентрации лимитирующего субстрата в культуральной среде. Кроме того, для малых концентрации субстрата ($S < K$) углы наклона всех вышеуказанных классических моделей субстрат-зависимого роста близки. Поэтому использование зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата в виде ломаной является целесообразным.

Рассмотрим случай лимитирования роста культуры микроводорослей субстратом S ($S < K$):

$$\mu = \frac{\mu_0}{K} \cdot S - \mu_r. \quad (1.7)$$

В выражении (1.7) максимальную удельную скорость синтеза, удельную скорость потерь биомассы и константу насыщения будем считать постоянными видоспецифичными коэффициентами, которые можно определить экспериментально. Таким образом, при уменьшении концентрации лимитирующего субстрата в среде удельная скорость роста линейно снижается.

Продифференцируем уравнение (1.7) по времени:

$$\frac{d\mu}{dt} = \frac{\mu_0}{K} \cdot \frac{dS}{dt}.$$

По определению, удельная скорость есть скорость роста единицы биомассы:

$$\mu = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt}.$$

Теперь производная от удельной скорости роста по времени примет вид:

$$\frac{d\mu}{dt} = \frac{1}{B} \cdot \frac{d^2 B}{dt^2} - \frac{1}{B^2} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)^2. \quad (1.8)$$

Для получения искомого решения биомассы от времени в уравнение (1.8) необходимо записать значение скорости изменения концентрации лимитирующего субстрата dS/dt . Будем считать, что скорость изменения концентрации лимитирующего субстрата в среде прямопропорциональна скорости синтеза биомассы:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_s^0 \cdot \frac{dB_s}{dt}, \quad (1.9)$$

где Y_s^0 – истинная потребность клеток в лимитирующем субстрате – количество лимитирующего субстрата необходимое для синтеза единицы биомассы. При дальнейших расчётах будем считать значение истинной потребности величиной постоянной. Такое предположение является довольно упрощённым, так как известно, что при лимитировании роста культуры микроводорослей одним из биогенных элементов происходит изменение биохимического состава клеток [Fresnedo, Serra, 1992; Gatenby, Orcutt, Kreeger et. al., 2003; Torzillo, Faraloni, Silva et. al., 2012]. Однако в том случае, если клетки микроводорослей адаптированы к малым концентрациям субстрата, то значительного изменения биохимического состава культуры не происходит.

По определению, скорость синтеза биомассы можно выразить через удельную скорость синтеза μ_s . В условиях поставленной задачи, удельная скорость синтеза биомассы будет изменяться, так как мы имеем дело с лимитированным ростом:

$$\frac{dB_s}{dt} = (\mu + \mu_r) \cdot B.$$

Балансовое уравнение (1.9) запишем в виде:

$$\begin{aligned}
\frac{dS}{dt} &= -Y_S^0 \cdot (\mu + \mu_r) \cdot B, \\
\frac{dS}{dt} &= -Y_S^0 \cdot \mu \cdot B - Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot B, \\
\frac{dS}{dt} &= -Y_S^0 \cdot \frac{dB}{dt} - Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot B.
\end{aligned} \tag{1.10}$$

Подставляя выражения (1.8) и (1.10) в (1.7), получим дифференциальное уравнение зависимости плотности культуры от времени:

$$B \cdot \frac{d^2 B}{dt^2} - \left(\frac{dB}{dt} \right)^2 + \gamma \cdot \frac{dB}{dt} \cdot B^2 + \gamma \cdot \mu_r \cdot B^3 = 0, \tag{1.11}$$

где $\gamma = \frac{\mu_0 \cdot Y_S^0}{K}$.

Для решения данного уравнения необходимо произвести замену:

$$\frac{dB}{dt} = P. \tag{1.12}$$

По сути, последнее уравнение есть запись выражения для продуктивности (абсолютной скорости роста). Для нахождения второй производной по биомассе, продифференцируем (1.12) и подставим в (1.11):

$$\frac{dP}{dB} = \frac{P}{B} - \gamma \cdot B - \gamma \cdot \mu_r \cdot \frac{B^2}{P}.$$

Первое слагаемое правой части последнего выражения есть удельная скорость роста:

$$\begin{aligned}
\mu &= \frac{P}{B}, \\
P &= \mu \cdot B, \\
\frac{dP}{dB} &= \mu + B \cdot \frac{d\mu}{dB}.
\end{aligned}$$

Подставим:

$$\mu + B \cdot \frac{d\mu}{dB} = \mu - \gamma \cdot B - \gamma \cdot \mu_r \cdot B \cdot \frac{1}{\mu},$$

Разделяя переменные, интегрируем при начальных условиях $\mu = \mu_m$, $B = B_k$:

$$B = B_k - \frac{\mu}{\gamma} + \frac{\mu_m}{\gamma} + \frac{\mu_r}{\gamma} \cdot \ln \left(\frac{\mu + \mu_r}{\mu_0} \right).$$

Рассмотрим граничное условие: при достижении культурой стационарной фазы роста, удельная скорость роста будет равняться нулю, а биомасса достигнет своего максимального значения $B = B_{st}$:

$$B = B_m - \frac{\mu}{\gamma} - \frac{\mu_r}{\gamma} \cdot \ln \left(1 - \frac{\mu}{\mu + \mu_r} \right). \tag{1.13}$$

Для нахождения искомого решения зависимости биомассы от времени необходимо произвести обратные замены в (1.13) с последующим интегрированием полученных выражений. Однако зависимость (1.13) является трансцендентным уравнением, решение которого нельзя выразить в аналитическом виде, поэтому разложим (1.13) в ряд Тейлора в окрестностях нуля:

$$\ln\left(1 - \frac{\mu}{\mu + \mu_r}\right) = -\frac{\mu}{\mu_r} + \frac{\mu^2}{2 \cdot \mu_r^2} - \dots$$

$$B = B_m - \frac{\mu}{\gamma} - \frac{\mu_r}{\gamma} \cdot \left(-\frac{\mu}{\mu_r} + \frac{\mu^2}{2 \cdot \mu_r^2}\right) = B_m - \frac{\mu^2}{2 \cdot \gamma \cdot \mu_r}.$$

Выразим удельную скорость роста из последнего выражения:

$$\mu = \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s^0}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_{st} - B)}. \quad (1.14)$$

Уравнение (1.14) применимо в случае лимитирования роста накопительной культуры микроводорослей одним из минеральных невозвратных компонентов питательной среды, причём диапазон изменения плотности культуры составляет от B_K до B_{st} , а удельной скорости роста – от μ_m до 0. Уравнение (1.14) показывает, что при лимитировании роста культуры удельная скорость роста уменьшается пропорционально корню квадратному от биомассы. На рисунке 1.2 представлены типовые теоретические кривые зависимости удельной скорости роста от биомассы по (1.14) при различных значениях коэффициента истинной потребности. Значения неизвестных коэффициентов получены из работы [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001], считая, что фаза лимитирования роста спироулины азотом началась с момента начала эксперимента. Величину удельной скорости потерь биомассы будем считать равной $0,1 \text{ сут}^{-1}$. Приведённые графики показывают, что при увеличении истинной потребности клеток микроводорослей в лимитирующем биогенном элементе, удельная скорость роста культуры достигает нулевого значения при меньших величинах стационарной плотности накопительной культуры.

Подобные кривые зависимости удельной скорости роста от величины биомассы часто наблюдаются экспериментально. Например, на рисунке 1.3 представлена зависимость удельной скорости роста спироулины от плотности культуры по тем же данным [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001]. Стоит отметить высокое соответствие теоретической кривой (1.14) и экспериментальных данных ($R^2 = 0,9$). Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1.14) позволила определить обобщённый коэффициент подкоренного выражения, с помощью которого можно рассчитать значение коэффициента истинной потребности спироулины в азоте при известных μ_0 и K (см. выше) – 50 мг N/ г СВ .

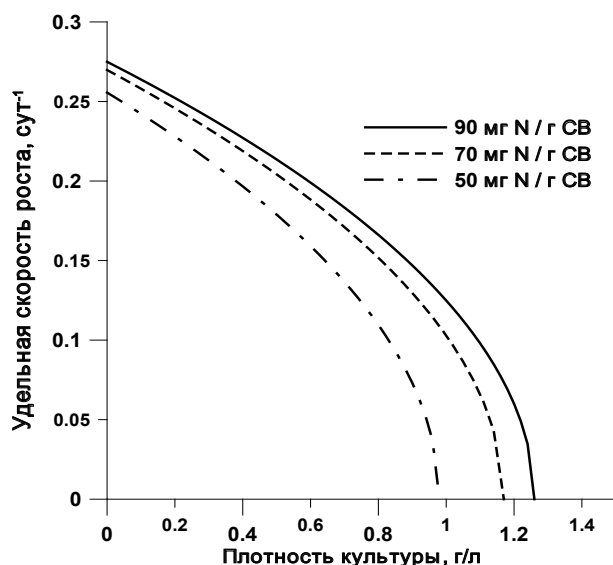


Рисунок 1.2. Теоретические кривые зависимости удельной скорости роста от плотности культуры по уравнению (1.14) при различных величинах коэффициента истинной потребности
 Figure 1.2. Theoretical curves of dependence of specific growth rate on the culture density according to the equation (1.14) for different values true need coefficient

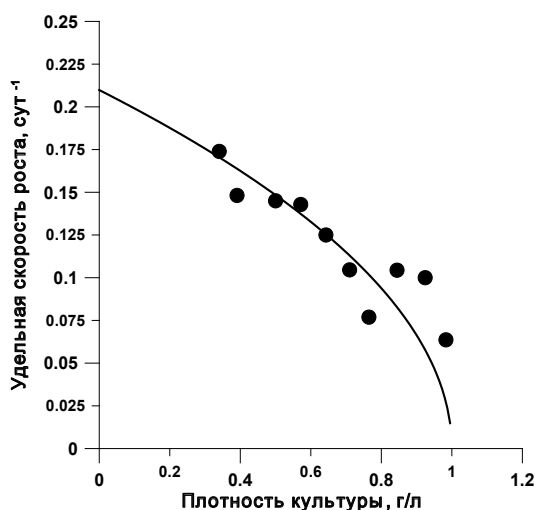


Рисунок 1.3. Зависимость удельной скорости роста от плотности культуры по данным [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001] при лимитировании роста нитратным азотом. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1.14)
 Figure 1.3. The dependence of specific growth rate on the culture density according to [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001] in the nitrate limit conditions. Line – approximation of experimental data by equation (1.14)

Для определения зависимости продуктивности от плотности культуры необходимо выполнить обратную подстановку, получаем уравнение для скорости роста:

$$P = \mu \cdot B = B \cdot \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_S^0}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_{st} - B)} . \quad (1.15)$$

Уравнение (1.15) показывает зависимость абсолютной скорости роста культуры от величины её плотности. На рисунке 1.4 данная зависимость представлена графически для различных значений коэффициента истинной потребности. При увеличении Y_S^0 мы наблюдаем более высокую максимальную продуктивность. Как и в случае с удельной скоростью роста (1.15) применимо только на участке лимитирования роста минеральным субстратом, причём диапазон изменения плотности культуры от B_K до B_{st} , а продуктивности от $\mu_m \cdot B_K$ до 0.

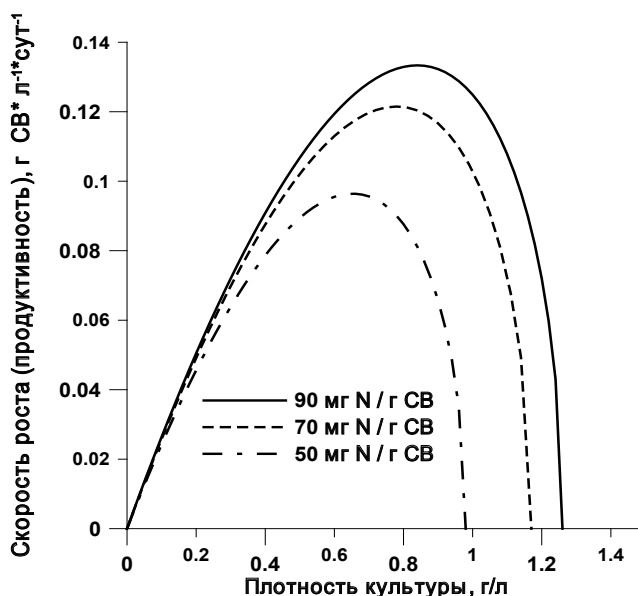


Рисунок 1.4. Теоретические кривые зависимости скорости роста от плотности культуры по уравнению (1.15) при различных величинах коэффициента истинной потребности
Figure 1.4. Theoretical curves of growth rate on the culture density by equation (1.15) for different values true need coefficient

Теперь можно записать дифференциальное уравнение, описывающее изменение биомассы во времени:

$$\frac{dB}{dt} = B \cdot \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_S^0}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_{st} - B)}.$$

Решение последнего уравнения с учетом двух обобщённых коэффициентов:

$$K_B = \operatorname{arch}\left(\sqrt{\frac{B_{st} - B_K}{B_{st}}}\right), a_1 = 2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_S^0}{K} \cdot \mu_r \cdot B_{st}$$

можно записать в виде:

$$B = B_{st} - B_{st} \cdot th \left(K_B - \frac{\sqrt{a_1}}{2} (t - t_K) \right)^2. \quad (1.16)$$

Уравнение (1.16) применимо для описания динамики плотности культур микроводорослей (в диапазоне от B_k до B_{st}) при лимитировании их роста пластическим субстратом, доля возврата которого в биосинтетические процессы близка нулю, либо время возврата достаточно велико. Например, таким пластическим субстратом может выступать минеральный азот в нитратной форме. На рисунке 1.5 представлены типовые теоретические кривые зависимости плотности культуры от времени для различных значений коэффициента истинной потребности. Анализируя рисунок 1.5, мы видим, что в соответствии с предложенной моделью и её математической записью в виде уравнения (1.16), плотность накопительной культуры увеличивается до максимального значения. Это обусловлено тем, что концентрация лимитирующего субстрата достигает компенсационного значения $S_K = \mu_r \cdot K / \mu_0$, при этом наблюдаемая скорость роста равна нулю. В следующий момент времени процессы деструкции биомассы преобладают над синтезом, что приводит к снижению плотности культуры. Культура переходит в фазу отмирания, что на графике представлено уменьшением биомассы вплоть до нулевого значения. Однако предлагаемая модель базируется на предположении о полной потере субстрата, который выделяется из распавшейся биомассы. В случае если происходит возврат лимитирующего субстрата, на фазе отмирания будут наблюдаться колебания плотности культуры [Лелеков, Геворгиз, 2013], период которых определяется временем возврата, а предложенная модель не применима.

Полученная модель (1.16) применена при описании экспериментальных данных роста культуры *A. platensis* в условиях лимитирования азотом. В опытном варианте содержание азота было уменьшено в 2 раза по сравнению с контрольным. Полученные результаты представлены на рисунке 1.6. Анализируя рисунок 1.6, можно отметить высокое соответствие предлагаемой модели с реальными экспериментальными данными ($R^2 = 0,93$). Следует отметить, что уравнения экспоненциальной фазы и фазы лимитирования (1.16) не сходятся в одну точку: на графике мы наблюдаем "разрыв" примерно на шестые сутки. Это связано с тем, что эта точка соответствует моменту, когда концентрация лимитирующего субстрата (в данном случае азота) снижается до константы насыщения K . Именно в области этой концентрации уравнение зависимости $\mu(S)$ в виде ломанной хуже всего описывает экспериментальные данные. Кроме того, при переходе культуры из экспоненциальной в фазу лимитирования роста происходят изменения биохимического состава клеток микроводорослей.

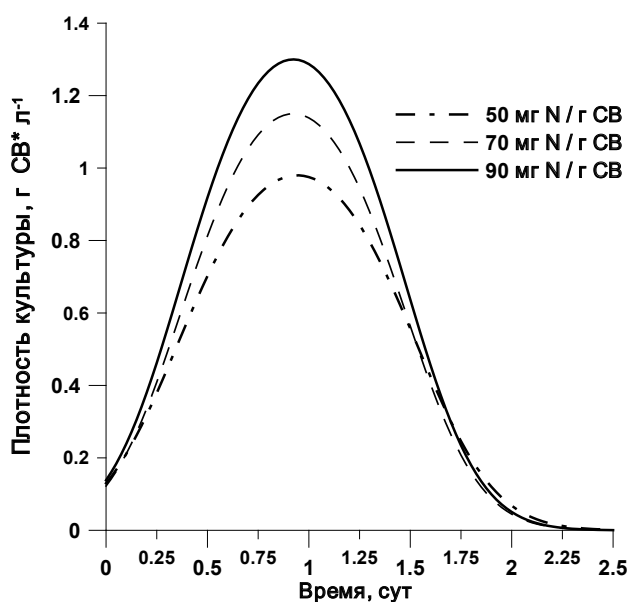


Рисунок 1.5. Теоретические кривые динамики плотности культуры микроводорослей по уравнению (1.16) при различных величинах коэффициента истинной потребности
 Figure 1.5. Theoretical curves of culture density by equation (1.16) for different values true need coefficient

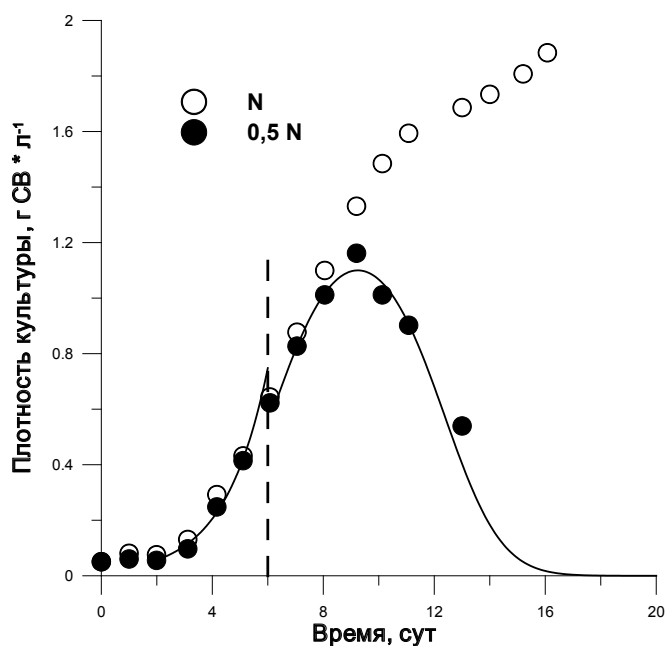


Рисунок 1.6. Накопительные кривые роста культуры *A. platensis* при различном начальном содержании нитратного азота в среде. Линии – аппроксимация фазы замедления роста уравнением (1.16). Пунктирная линия – момент начала лимитированного роста
 Figure 1.6. Batch growth curves of *A. platensis* culture for different initial content of nitrate in the medium. Lines – approximation of the deceleration phase by equation (1.16). Dotted line – the start of limited growth

Для корректного описания динамики плотности культуры микроорганизмов необходимо учитывать способ подачи лимитирующего субстрата в культуру, а также моменты смены лимитирующих факторов на накопительной кривой. Если накопительная кривая имеет точку перегиба, то кривую следует разбить на два участка: фаза ускорения роста и фаза замедления роста. В закрытой системе для описания фазы ускорения роста используется экспоненциальная зависимость (1.1). В точке перегиба накопительной кривой продуктивность культуры достигает своего максимального значения. Затем, продуктивность начинает снижаться, т. е. культура переходит в фазу замедления роста. Снижение продуктивности обусловлено истощением лимитирующего субстрата из среды. По аналогии с фазой ускорения роста после точки перегиба динамику плотности культуры в пределах величины ошибки измерения можно описать либо логистической функцией, либо функцией (1.16). При определённых внешних условиях на накопительной кривой может отсутствовать экспоненциальная фаза роста, что свидетельствует о лимитировании роста с начального момента времени, т. е. с этого момента времени начинается фаза замедления роста, которая описывается уравнением (1.16).

ГЛАВА 2

Моделирование накопительной культуры микроводорослей в различных фазах роста

Основной кинетической характеристикой роста микроводорослей является скорость роста, которая определяется процессами фотобиосинтеза и зависит от скорости синтеза биомассы. Однако, рассматривая рост в общем случае, необходимо учитывать процессы, происходящие в клетке, напрямую не связанные с синтезом. К таким процессам относится механизм поддержания структуры клетки. Этот механизм у микроводорослей малоизучен. Известно, что при низких интенсивностях света в клетках явно наблюдается так называемое «темновое» дыхание, сопровождающееся поглощением кислорода и уменьшением биомассы клеток. Выделение кислорода и рост микроводорослей начинается только после увеличения интенсивности света выше некоторой величины (соответствующей компенсационному пункту фотосинтеза), при которой скорости выделения и поглощения кислорода равны.

В общем случае, рост и биосинтез компонентов клетки является результатом двух процессов: собственно фотосинтеза и дыхания. Расходы на дыхание, связанные с ростом (фотодыхание) пропорциональны «чистому» фотосинтезу, их трудно вычленивать из общего процесса, обычно при моделировании подразумевается, что «чистый» фотосинтез уже включает этот процесс. Поэтому рост можно рассматривать как разность двух процессов: «чистого» фотобиосинтеза и «темнового» дыхания.

Синтезированная в процессе роста биомасса (B) может быть представлена как сумма её биохимических составляющих:

$$B = \sum_{k=1}^{k=n} B_k,$$

где B_k – масса k -го компонента; k – номер составляющих, $k = 1, 2, \dots, n$; n – общее количество биохимических составляющих.

Содержание данного компонента в биомассе может быть выражено в относительных единицах:

$$\beta_k = \frac{B_k}{B} = \frac{B_k}{\sum_{k=1}^{k=n} B_k}.$$

Скорость синтеза биомассы (P_0) будет равна сумме скоростей синтеза всех биохимических составляющих (P_0^k):

$$P_0 = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 = \sum_{k=1}^{k=n} P_0^k = \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB^k}{dt}.$$

Скорость темнового дыхания (P_r), связанного с расходами на поддержание структуры, считают пропорциональным биомассе:

$$P_r = \sum_{k=1}^{k=n} \mu_r^k \cdot B_k \cong \mu_r \cdot B,$$

где μ_r – удельная скорость темнового дыхания (или расхода биомассы на поддержание структуры); μ_r^k – удельная скорость расхода данного компонента биомассы на поддержание структуры.

Скорость роста (или наблюдаемая скорость синтеза биомассы), P , будет равна разности скоростей «чистого» фотосинтеза и потерь на дыхание:

$$P = P_0 - P_r,$$

$$P = \frac{dB}{dt} = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r \cdot B.$$

Аналогично, с учетом расхода на дыхание, можно наблюдаемую скорость синтеза данного компонента (P_k) представить как разность скорости синтеза (P_k^0) и скорости потерь данного компонента при дыхании (P_k^r):

$$P_k = P_k^0 - P_k^r,$$

$$P_k = \frac{dB_k}{dt} = P_k^0 - \mu_r^k \cdot B_k.$$

Запишем уравнение скорости роста в виде:

$$P = \frac{dB}{dt} = P_0 - P_r = \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB_0^k}{dt} - \sum_{k=1}^{k=n} \mu_r^k \cdot B_k = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r \cdot B.$$

Величина скорости, как характеристика роста, не всегда удобна для сравнительных оценок, т. к. её значение зависит от количества растущей биомассы. Этого недостатка лишена другая характеристика роста – удельная скорость роста (μ). Удельная скорость роста растений по Блэкману [Blackman, 1919] представляет собой величину скорости роста, нормированную относительно биомассы. Т. е. удельная скорость роста показывает, сколько единиц биомассы синтезирует каждая единица биомассы в единицу времени:

$$\mu = \frac{dB}{B \cdot dt}.$$

$$\mu = \frac{P}{B} = \frac{P_0}{B} - \frac{P_r}{B} = \frac{1}{B} \cdot \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB_0^k}{dt} - \frac{1}{B} \cdot \sum_{k=1}^{k=n} \mu_r^k \cdot B_k = \frac{1}{B} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r.$$

Обозначим удельную скорость синтеза биомассы через (μ_0):

$$\mu_0 = \frac{1}{B} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)_0,$$

тогда

$$\mu = \mu_0 - \mu_r.$$

Рассмотрим случай неограниченного роста биомассы, при условии, что удельная скорость роста не изменяется с течением времени, т. е. $\mu = \text{const}$. Общее количество биомассы можно определить исходя из уравнения удельной скорости роста (по определению):

$$\mu = \frac{dB}{B \cdot dt}.$$

Разделив переменные, задав начальные условия (в момент времени $t_0 = 0$, биомасса равна B_0) и интегрируя, получим формулу динамики роста биомассы:

$$\int_{B_0}^B \frac{dB}{B} = \mu \cdot \int_0^t dt,$$

$$\ln \frac{B}{B_0} = \mu \cdot t,$$

$$B = B_0 \cdot \exp^{\mu \cdot t}.$$

Формула применима для ограниченных промежутков времени при изучении глобальных процессов фотобиосинтеза. Для микроводорослей применение этой формулы также ограничено, т. к. биомасса одной клетки не может быть выше некоторой величины, при достижении которой клетка делится. Однако общую биомассу можно представить как сумму масс отдельных клеток:

$$B = \sum_{k=1}^{k=n} b_k,$$

где b_k – масса k -й клетки; k – номер клетки, $k=1, 2 \dots n$; n – общее количество клеток.

Несмотря на очевидную простоту этой связи, она весьма полезна в математическом отношении, т. к. появляется возможность оперирования непрерывными величинами (биомасса) вместо дискретных (число клеток). Особенно это важно для небольшого числа клеток, т. к. в реальности мы имеем дело с ограниченными объемами, в которых растут микроводоросли.

Рассмотрим культуру микроводорослей как популяцию, состоящую из большого числа клеток. Принимая, что прирост числа клеток dn за бесконечно малый промежуток времени dt , пропорционален числу клеток n , можно записать дифференциальное уравнение:

$$\frac{dn}{dt} = \mu \cdot n.$$

Здесь μ – константа роста. Эту константу называют удельной скоростью размножения, темпом деления клеток, удельной скоростью деления, константой размножения и т.д.

Если промежуток времени между делениями клеток (время генерации) обозначить через g_d , а клетка делится на d дочерних клеток, то константа роста:

$$\mu = \frac{\ln d}{g_d}.$$

В случае деления клетки на две дочерних:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g_2}.$$

Из этого выражения находим время удвоения биомассы (при любом числе дочерних клеток), которое численно равно времени генерации для клеток делящихся на две части:

$$g_2 = \frac{\ln 2}{\mu}.$$

Если возрастная структура популяции не изменяется в течение некоторого времени, а, следовательно, не изменяется и средняя масса клетки (\bar{b}), то константа роста на этом промежутке времени равна удельной скорости роста (по биомассе):

$$\mu = \frac{dn}{n \cdot dt} = \frac{\bar{b} \cdot dn}{\bar{b} \cdot n \cdot dt} = \frac{dB}{B \cdot dt}.$$

Эта формула показывает эквивалентность кинетической характеристики роста биомассы микроводорослей и популяционной характеристики их роста.

В дальнейшем вместо числа клеток n и биомассы B , будем использовать их объёмные или поверхностные концентрации. В случае выращивания микроводорослей используют термин плотность культуры, который эквивалентен понятию концентрации клеток или биомассы.

Таким образом, в качестве характеристики роста микроводорослей можно использовать величины скорости роста (= абсолютная, валовая скорость или продуктивность) и удельной скорости роста.

2.1. Периодическая (накопительная) культура

В реальности рост микроводорослей всегда ограничен. Особенно наглядно это проявляется при искусственном выращивании микроводорослей. Существует два основных способа культивирования клеток: накопительная (периодическая) и непрерывная культура, которые являются крайними случаями всех возможных режимов выращивания микроводорослей.

В случае накопительного способа выращивания в освещаемый культиватор, заполненный питательной средой, содержащей необходимые для роста биогенные элементы, вносится небольшое количество клеток микроводорослей (инокулят). Рост микроводорослей приводит со временем к увеличению концентрации клеток до некоторой максимальной плотности культуры. Эта плотность ограничена либо элементами минерального питания, либо интенсивностью света, либо накоплением метаболитов, либо

другими физико-химическими условиями среды. Графически такой рост изображается S-образной кривой, форма которой зависит от условий, в которых выращиваются клетки, и кинетических характеристик культуры микроводорослей. Типичный график изменения плотности культуры микроводорослей в зависимости от времени выращивания (возраст культуры) представлен на рис. 2.1.

В целом динамика роста периодической культуры микроводорослей аналогична накопительным кривым любых других микробиологических культур [Monod, 1949]. Накопительная кривая культуры микроводорослей условно разделена на несколько периодов (фаз) роста, характеризующихся определенными величинами кинетических параметров.

Лag-фаза. Как правило, для первоначального периода роста и развития культуры характерно либо отсутствие роста, либо скорость отрицательна, при этом происходит уменьшение числа клеток или биомассы. В это время клетки микроводорослей адаптируются к новым условиям среды. Длительность периода занимает от нескольких минут до нескольких суток, в зависимости от различия условий, в которых клетки находились до внесения их в данную среду и новыми условиями.

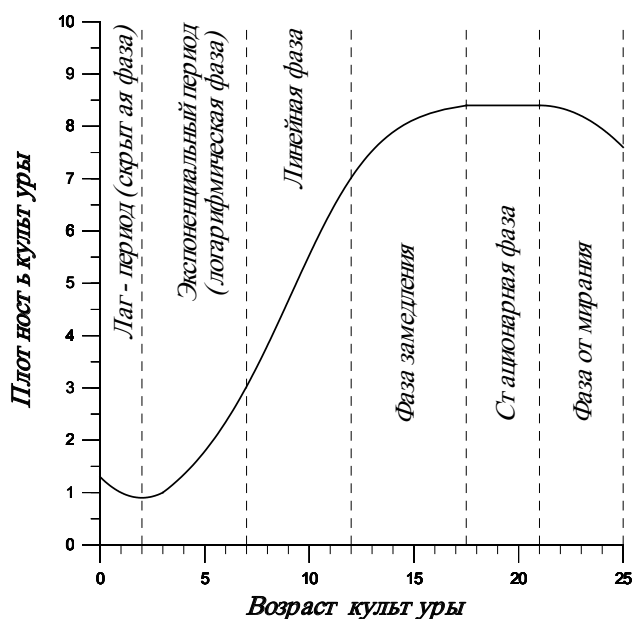


Рисунок 2.1. Динамика накопления биомассы или концентрации клеток в периодической культуре микроводорослей. Штриховыми линиями обозначены условные границы между фазами роста культуры

Figure 2.1. Dynamics of accumulation of biomass or cells concentration in batch culture of microalgae. Dashed lines designate conditional borders between growth phases of culture

Логарифмическая (лог-фаза, экспоненциальная) фаза роста. Величина удельной скорости в этой фазе роста определяется, в основном, световыми условиями, которые для низких плотностей культуры неизменны,

т. к. клетки не затеяют друг друга. Этот период характеризуется постоянством удельной скорости роста ($\mu_m = const$). Следовательно, для логарифмической фазы роста применима зависимость плотности культуры от времени, которую мы получили ранее для неограниченного роста биомассы:

$$\ln \frac{B}{B_{ln}} = \mu_m \cdot (t - t_{ln}),$$

$$B = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})}, \quad (2.1)$$

где B_{ln} – биомасса в начале лог-фазы t_{ln} .

Такая двоякая (логарифмическая и экспоненциальная) запись формулы динамики роста породила и двоякое название этой фазы. Используя формулу связи биомассы и числа клеток, можно записать выражения для динамики концентрации клеток в логарифмической фазе роста культуры:

$$\ln \frac{n}{n_{ln}} = \mu_m \cdot (t - t_{ln}),$$

$$n = n_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})}.$$

Последнее выражение полностью идентично закону Мальтуса для неограниченного роста популяций. В полулогарифмическом масштабе зависимость логарифма числа клеток от времени будет изображаться прямой. Тангенс угла наклона прямой к оси времени будет равен удельной скорости роста:

$$\mu_m = \frac{1}{t - t_{ln}} \cdot \ln \frac{n}{n_{ln}} = \frac{\ln n - \ln n_{ln}}{t - t_{ln}}.$$

Такой простой способ измерения удельной скорости роста микроводорослей часто используется в экспериментальных исследованиях. При этом почти всегда допускается ошибка, связанная с тем, что для определения скорости используют две экспериментальные точки, априори полагая постоянство удельной скорости роста на промежутке между точками. Опыт показывает, что длительный строго экспоненциальный рост микроводорослей наблюдается крайне редко. Однако, даже такие, ориентировочные оценки удельной скорости роста, часто важны для сравнительного анализа.

Отметим следующий момент: все факторы, ограничивающие рост культуры водорослей, можно разделить на 3 группы. Во-первых, это энергетический субстрат, к которому отнесём световые условия. Во-вторых, это газовая составляющая: обеспеченность углекислым газом, вынос кислорода и т. д. И, в-третьих, это минеральные компоненты питательной среды. Общее влияние упомянутых факторов определяет форму накопительной кривой. Верно и обратное утверждение – по форме накопительной кривой можно судить о лимитирующих рост факторах, последовательности их действия.

На лог-фазе единственным ограничивающим фактором может являться только величина внешнего светового потока. При увеличении освещённости (если минерального и газового субстрата достаточно), увеличится удельная скорость роста культуры μ_m . В результате мы полу-

чим всё тот же экспоненциальный рост, только при большем угле наклона кривой к оси абсцисс. В пределе, при некоторой пороговой освещенности $I_{пор}$, мы будем наблюдать максимально возможную, генетически заложенную удельную скорость роста культуры. С другой стороны, уменьшение светового потока приведет к уменьшению скоростей роста культуры.

Линейная фаза роста. Далее культура переходит в следующую фазу роста, отличную от экспоненциального закона. В большинстве случаев мы наблюдаем фазу линейного роста, характеризующуюся постоянством продуктивности культуры. Это возможно только в случае постоянства потока лимитирующего субстрата в систему, в соответствии с теорией о лимитирующих факторах [Liebig, 1847; Blackman, 1905; Тренкеншу, 2005]. Рассмотрим случай лимитирования роста на линейной фазе световым потоком, приняв за константу внешнюю освещенность. Тогда с увеличением плотности культуры увеличится темновое дыхание, которое приведёт к распаду части биомассы. Это означает, что энергетический субстрат, задействованный при её синтезе, безвозвратно теряется. С увеличением плотности культуры потери увеличиваются, а возврата субстрата из распавшейся биомассы не происходит. В связи с этим, линейный рост в данном случае невозможен. В случае лимитирования минеральным субстратом поток определяется первоначальной концентрацией элементов в питательной среде. С ростом культуры происходит потребление минеральных компонентов среды. Темновое дыхание будет приводить к распаду биомассы, но в отличие от энергетического субстрата, возврат минеральных веществ в среду возможен. За счёт того, что распавшаяся биомасса должна быть минерализована, время возврата такого субстрата будет больше по сравнению со временем оборота ферментной системы, и, значит, скорости роста будут определяться только внешним потоком. Если взять газовую составляющую, то можно предположить, что возврат углекислоты из распавшейся биомассы происходит за время, соизмеримое со временем оборота "ферментной системы". Следовательно, газовый субстрат, выделившийся из распавшейся биомассы, будет тут же повторно задействован в биосинтезе. Таким образом, не произойдёт потеря, и скорость роста культуры в этом случае будет определяться только величиной внешнего потока субстрата, а при его постоянстве мы получим линейный закон роста для биомассы:

$$\begin{aligned} P_m &= k \cdot Y_S^0 \cdot V_{CO_2}, \\ B &= B_l + P_m \cdot (t - t_l), \end{aligned} \quad (2.2)$$

где k – коэффициент поглощения углекислоты культурой; Y_S^0 – экономический коэффициент по углероду; V_{CO_2} – скорость поступления углекислого газа; B_l – биомасса в момент начала линейной фазы t_l .

Из этого уравнения можно найти величину максимальной продуктивности, которая будет равна тангенсу угла наклона линейного участка кривой роста:

$$P_m = \frac{B - B_l}{t - t_l}.$$

С ростом плотности культуры удельная скорость роста будет уменьшаться обратно пропорционально плотности:

$$\mu = \frac{P_m}{B}.$$

Этот участок кривой роста позволяет довольно точно проследить изменение удельной скорости роста со временем:

$$\mu = \frac{P_m}{B} = \frac{P_m}{B_l + P_m \cdot (t - t_l)}.$$

Рассмотрим точку сопряжения экспоненциальной и линейной фаз. Чтобы определить момент времени, когда происходит начало лимитирования роста углекислотой, приравняем уравнения (2.1) и (2.2) (условие непрерывности роста культуры), учитывая, что $t = t_l$:

$$B_l = B_{\ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t_l - t_{\ln})}. \quad (2.3)$$

К условию непрерывности роста необходимо добавить условие непрерывности производных указанных функций:

$$B_{\ln} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot (t_l - t_{\ln})} = P_m.$$

Отсюда находим время t_l :

$$e^{\mu_m \cdot (t_l - t_{\ln})} = \frac{P_m}{B_{\ln} \cdot \mu_m},$$

$$\mu_m \cdot (t_l - t_{\ln}) = \ln\left(\frac{P_m}{B_{\ln} \cdot \mu_m}\right),$$

$$t_l = t_{\ln} + \frac{1}{\mu_m} \ln\left(\frac{P_m}{B_{\ln} \cdot \mu_m}\right).$$

Подставляя полученное значение t_l в выражение (2.3), мы можем считать плотность культуры B_l .

Итак, подчеркнём, что наличие линейной фазы свидетельствует о лимитировании роста углекислым газом, причем, скорость роста культуры определяется скоростью подачи углекислоты. Подобный вывод подтверждается многочисленными экспериментальными данными. Например, при культивировании микроводорослей *Dunaliella viridis* и *Isochrysis galbana* с продувкой воздухом (без добавления CO_2) и с продувкой газовой смеси, содержащей 2 % углекислого газа, продуктивность на линейной фазе роста изменялась, соответственно в 5 и 3 раза [Ладыгина, 2007] (рис. 2.2).

Окончание линейной фазы свидетельствует о смене лимитирующего фактора – культура переходит в фазу замедления роста. Здесь ограничивать рост могут и световые, и минеральные условия среды. Следует отметить, что при отсутствии линейной фазы на накопительной кривой, лимитирования по углекислоте не происходит, и на рост, в первую очередь, влияют другие факторы.

Фаза замедления роста. Фаза замедления роста у микроводорослей характеризуется тем, что скорость роста на этом участке накопительной кривой уменьшается. Это замедление может быть вызвано двумя причинами. В одном случае происходит смена лимитирующего фактора [Liebig, 1847; Blackman, 1905], т.е. концентрация какого либо биогенного элемента в среде уменьшается до уровня, при котором скорость синтеза определяется уже данным элементом, согласно кинетике Михаелиса-Ментен или Моно [Michaelis, Menten, 1913; Monod, 1949]. В конце фазы скорость роста снизится до нуля. В другом случае плотность культуры достигает величины, при которой скорость синтеза, определяемая внешним потоком, становится сравнимой со скоростью дыхания культуры, т.е. в конце фазы культура достигает компенсационного пункта фотосинтеза.

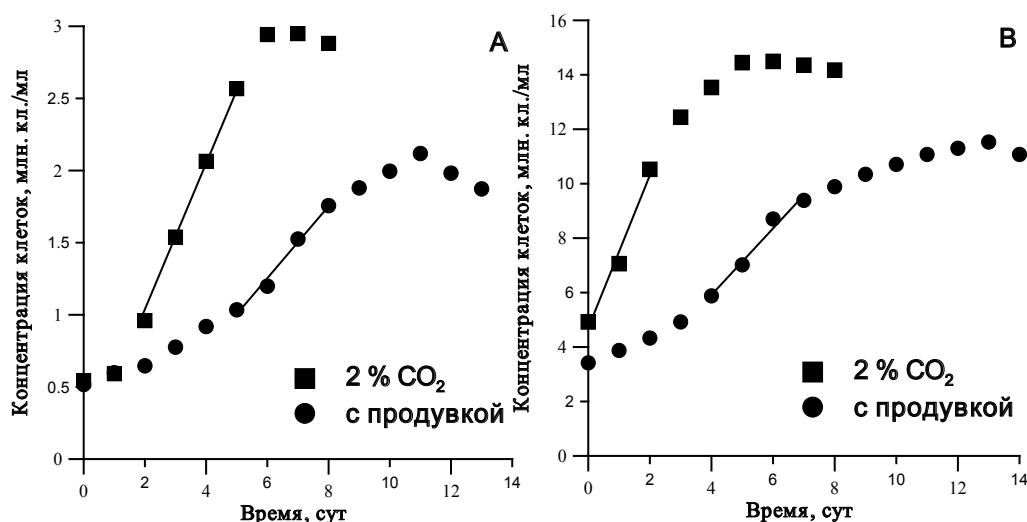


Рисунок 2.2. Накопительные кривые *Dunaliella viridis* (A) и *Isochrysis galbana* (B) в зависимости от углеродного питания [Ладыгина, 2007]. Аппроксимация линейной фазы роста уравнением (2.2)

Figure 2.1. Batch culture *Dunaliella viridis* (A) и *Isochrysis galbana* (B) depending on carbon nutrition [Ладыгина, 2007]. Approximation of the linear growth phase to equation (2.2)

Для продуктивности на этом участке можно записать уравнение:

$$P = P_0 - \mu_r \cdot B.$$

Величину скорости синтеза P_0 можно оценить как сумму продуктивности и скорости дыхания в конце линейной фазы (при плотности культуры B^l):

$$P_0 = P_m + \mu_r \cdot B^l.$$

В этом случае продуктивность для фазы замедления роста:

$$P = P_m + \mu_r \cdot B^l - \mu_r \cdot B = P_m - \mu_r \cdot (B - B^l).$$

В конце фазы замедления плотность культуры достигнет максимального значения B_m , а скорость роста станет равной нулю, что позволяет оценить удельную скорость дыхания:

$$P = P_m - \mu_r \cdot (B_m - B^l) = 0,$$

$$\mu_r = \frac{P_m}{B_m - B^l}.$$

Уравнения для скоростей роста культуры в фазе замедления можно записать в виде:

$$\frac{dB}{dt} = P_m - \frac{P_m}{B_m - B^l} \cdot (B - B^l) = P_m \cdot \frac{B_m - B}{B_m - B^l},$$

$$\mu = \frac{P_m}{B} \cdot \frac{B_m - B}{B_m - B^l}.$$

Разделив переменные и задав начальные условия (момент времени начала фазы замедления совпадает с концом фазы линейного роста, t_l , и плотность в этот момент равна B_l), уравнение можно проинтегрировать:

$$\int_{B^l}^B \frac{dB}{B_m - B} = \frac{P_m}{B_m - B^l} \cdot \int_{t^l}^t dt,$$

$$\ln \frac{B_m - B^l}{B_m - B} = \mu_r \cdot (t - t^l).$$

Преобразовав полученное выражение, получим уравнение динамики плотности культуры:

$$B = B_m - (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^l)} = B_m - (B_m - B^l) \cdot e^{-\frac{P_m}{B_m - B^l} \cdot (t - t^l)}. \quad (2.4)$$

Стационарная фаза. Характеризуется прекращением роста микродорослей ($\mu = 0$, $P = 0$). Культура достигает максимальной плотности B_m , величина которой зависит от световых условий, первоначальной концентрации субстрата, газовой среды и других физико-химических условий. При этом стационарность плотности по биомассе может не совпадать со стационарностью по концентрации клеток. Длительность стационарной фазы различна и может достигать нескольких суток.

Фаза отмирания. В фазе отмирания наблюдается превалирование процессов дыхания над процессами синтеза. Скорости роста (отрицательные) будут равны скоростям распада:

$$\mu = -\mu_r,$$

$$P = \frac{dB}{dt} = -\mu_r \cdot B.$$

Интегрируя последнее выражение при начальных условиях (в начале фазы отмирания, которому соответствует момент времени конца стационарной фазы t_{st} , плотность культуры равна B_m), получим уравнение динамики плотности культуры в фазе отмирания:

$$\int_{B_m}^B \frac{dB}{B} = -\mu_r \cdot \int_{t^{st}}^t dt,$$

$$\ln \frac{B}{B_m} = -\mu_r \cdot (t - t^{st}),$$

$$B = B_m \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^{st})}. \quad (2.5)$$

В фазе отмирания происходят глубокие физиологические изменения клеток микроводорослей, вплоть до их гибели. Скорости роста становятся отрицательными, происходит распад биомассы, что, как правило, приводит к развитию бактерий. Возникает некий новый альго-бактериальный ценоз, т. е. культура микроводорослей прекращает существование.

Если культуру микроводорослей из этой фазы использовать в качестве инокулята для новой периодической культуры, то часть клеток не сможет возвратиться к нормальной жизнедеятельности, т. е. в лаг-периоде будет также наблюдаться уменьшение биомассы. Этот процесс можно описать выражениями, аналогичными уравнениям для фазы отмирания:

$$\mu = -\mu_r,$$

$$P = \frac{dB}{dt} = -\mu_r \cdot B,$$

$$B = B_0 \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t_0)},$$

где B_0 – плотность культуры в момент времени внесения инокулята t_0 .

Таблица 2.1. Уравнения для расчета ростовых показателей микроводорослей в различных фазах развития периодической культуры

Table 2.1. The equations for calculation of microalgae's growth parameters in various phases of development of batch culture

Фазы роста	Простейшие математические модели роста		
	Удельная скорость	Продуктивность	Динамика плотности
Лаг-период	$\mu = -\mu_r$	$P = -\mu_r \cdot B$	$B = B_0 \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t_0)}$
Логарифмическая	$\mu = \mu_m$	$P = \mu_m \cdot B$	$B = B_{in} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{in})}$
Линейная	$\mu = P_m / B$	$P = P_m$	$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l)$
Замедления	$P = \mu_r \cdot (B_m - B) / B$	$P = \mu_r \cdot (B_m - B)$	$B = B_m - (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^l)}$
Стационарная	$\mu = 0$	$P = 0$	$B = B_m$
Отмирания	$\mu = -\mu_r$	$P = -\mu_r \cdot B$	$B = B_m \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^{st})}$

В таблице 2.1 приведены простейшие уравнения роста для различных фаз развития периодической культуры микроводорослей. Несмотря на приближенный характер предложенных моделей, они могут быть использованы для сравнительной количественной оценки ростовых характеристик

при изучении влияния факторов внешней среды на рост микроводорослей. Если в опытах измеряются биохимические показатели, то полученные уравнения можно применить для описания динамики исследуемых компонентов клеток и найти соотношение кинетических характеристик, например, количественно описать динамику содержания данного компонента в биомассе или в клетке. Такая количественная оценка очень важна для прогнозирования роста и состава клеток при изменении условий выращивания.

2.2. Определение границ фаз роста

Первым шагом в определении параметров любой накопительной кривой является установление границ различных фаз роста. К сожалению, в этом вопросе не существует общепризнанных формальных приёмов и поэтому вся ответственность данной процедуры принадлежит исследователю. Например, на рисунке 2.3 представлены две накопительные кривые роста микроводорослей. Они имеют типичную S-образную форму, тем не менее, трудно сказать принадлежат ли точки второго и третьего дня кривой № 1 к экспоненциальной фазе или линейной. Аналогичная неопределенность в отношении к точкам первого и второго дня у кривой 2. В данной работе будем полагать, что обе кривые разделены на фазы роста, как показано на рис. 2.3.

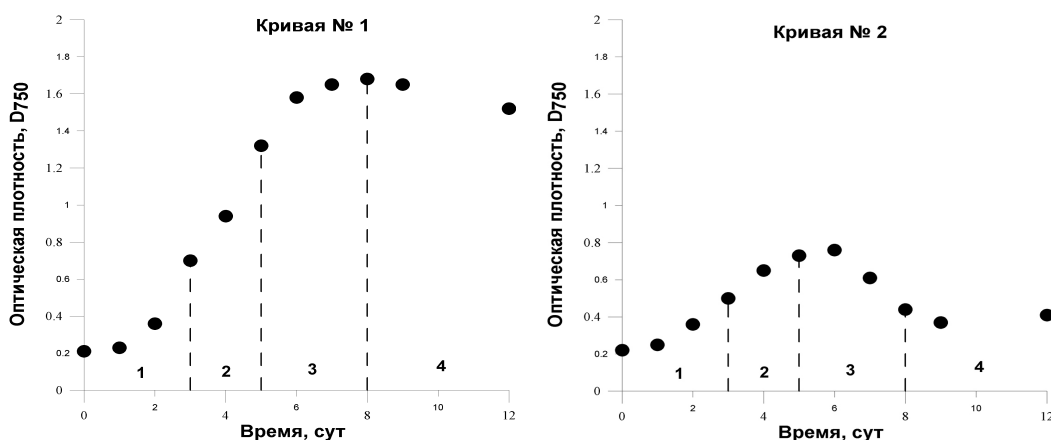


Рисунок 2.3. Накопительные кривые и фазы роста *D. salina*: 1 – экспоненциальная, 2 – линейная, 3 – замедления, 4 – отмирания

Figure 2.3. Batch curves and growth phase of *D. salina*: 1 - exponential, 2 - linear, 3 - deceleration, 4 – death

У кривых, представленных на рис. 2.3, мы не можем установить лаг-фазу даже приблизительно, поскольку на этом участке слишком мало точек. У данных кривых, если и есть лаг-фаза, то очень не продолжительная, поэтому описание этой фазы роста культуры мы проводить не будем.

Логарифмическая фаза роста характеризуется постоянством удельной скорости роста ($\mu_m = \text{const}$). Для логарифмической фазы роста применима зависимость плотности культуры от времени в виде (2.1). Построим данный участок для обеих кривых в полулогарифмических координатах, что позволяет получить линейную зависимость и величину максимальной удельной скоростью роста, которая численно равна тангенсу угла наклона прямой к оси абсцисс.

$$\ln \frac{D}{0,21} = \mu_m \cdot t$$

Для кривой № 1 имеем $\mu_m = 0,34$ и $D = 0,21 \cdot e^{0,34 \cdot t}$, а для кривой № 2 $\mu_m = 0,24$ и $D = 0,21 \cdot e^{0,24 \cdot t}$.

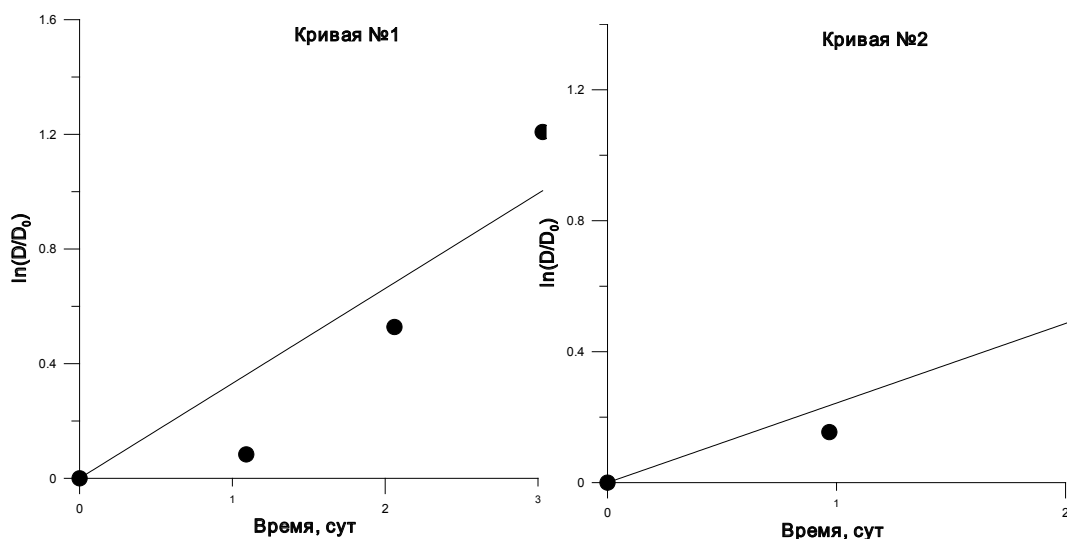


Рисунок 2.4. Представление экспоненциальной фазы роста в полулогарифмических координатах для расчета максимальной удельной скорости: для кривой №1 $\mu_m = 0.34$ (сут⁻¹), для кривой №2 $\mu_m = 0.24$ (сут⁻¹)

Figure 2.4. Representation of an exponential growth phase in semilogarithmic coordinates for calculation of maximum specific growth rate: for a curve №1 $\mu_m = 0.34$ (d⁻¹), for a curve №2 $\mu_m = 0.24$ (d⁻¹)

Фаза линейного роста характеризуется постоянством скорости роста (продуктивности культуры, $P = P_m = \text{const}$). Уравнение роста для линейной фазы (2.2):

Для кривой №1 и №2, соответственно:

$$D = 0,7 + P_m \cdot (t - 3),$$

$$D = 0,36 + P_m \cdot (t - 2).$$

Тангенс угла наклона линейной зависимости (см. рис. 2.5) в координатах D-D и t-t₁ численно равен величине P_m , т. е. находим для кривой №1 $P_m = 0,3$, для кривой №2 $P_m = 0,138$.

Фаза замедления роста характеризуется снижением скорости роста до нуля, при этом концентрация биомассы достигает своего максимального значения B_m .

Динамику роста культуры в фазе замедления можно представить в виде (2.4).

Подставляя соответствующие значения, запишем для кривой №1:

$$D = 1,68 - (1,68 - 1,32) \cdot e^{-\frac{0,3}{1,68-1,32} \cdot (t-5)} = 1,68 - 0,36 \cdot e^{-0,83 \cdot (t-5)}.$$

Аналогично для кривой №2:

$$D = 0,76 - (0,76 - 0,64) \cdot e^{-\frac{0,138}{0,76-0,64} \cdot (t-4)} = 0,76 - 0,12 \cdot e^{-1,15 \cdot (t-4)}$$

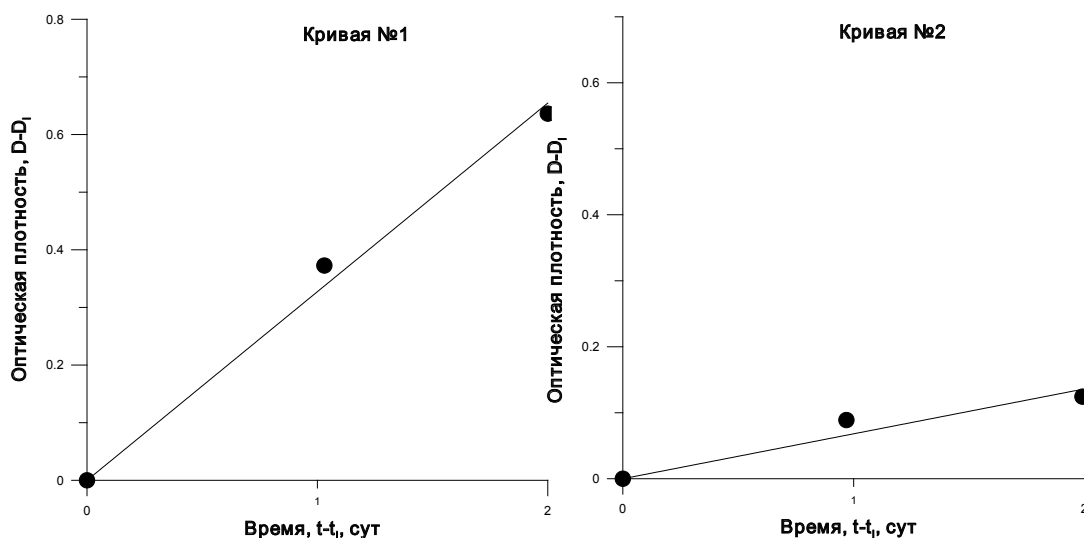


Рисунок 2.5. Расчет максимальной продуктивности культуры по данным линейной фазы роста: для кривой №1 $P_m = 0,3$ для кривой №2 $P_m = 0,138$

Figure 2.5. Calculation of maximum productivity of culture under the data of a linear growth phase: for a curve №1 $P_m = 0,3$ for a curve №2 $P_m = 0,138$

Стационарная фаза характеризуется прекращением роста микроводорослей ($P = 0$). В данной фазе биомасса остается неизменной, равной максимальному значению B_m . У кривых № 1 и № 2 стационарная фаза отсутствует, поэтому мы ее не рассматриваем.

Фаза отмирания характеризуется отрицательной скоростью роста. Динамика плотности культуры представляется в виде (2.5). Удельную скорость дыхания μ_r определим как тангенс угла наклона прямой, представив фазу отмирания в координатах: $\ln(B/B_m)$, $(t-t_{st})$.

В результате имеем $D = 1,68 \cdot e^{-0,028 \cdot (t-8)}$ для кривой № 1 и $D = 0,76 \cdot e^{-0,25 \cdot (t-6)}$ для кривой № 2.

Таким образом, мы получили аналитические выражения, описывающие различные фазы роста накопительной кривой. Ниже представлены значения удельной скорости роста и продуктивности для двух кривых.

Рассматривая накопительную кривую в целом, заметим, что в точках границ различных фаз из-за ошибки измерений будет наблюдаться либо неоднозначность, либо изломы, что никак не вписывается в представление о непрерывности функции роста. Однако, такие неточности несравнимы с ошибками, возникающими при использовании формулы (2.1), к примеру, для фазы замедления роста, более того, уменьшение измерительной ошибки и промежутка между измерениями устранил указанное несоответствие.

ГЛАВА 3

Моделирование роста квазинепрерывной культуры микроводорослей

Рассмотрим рост культуры микроводорослей, который сопровождается вмешательством экспериментатора в процессы роста в любой фазе развития периодической культуры, например, посредством разбавления культуры питательной средой. Картина роста будет зависеть от величины этого разбавления и используемой среды. При определенных условиях (неизменность биохимического состава, возрастной структуры популяции клеток, концентрации метаболитов и др.) динамика роста после разбавления будет повторять прежнюю. Процедуру разбавления можно повторять неоднократно, в результате чего в культиваторе будет наблюдаться непрерывный рост культуры. Подбирая относительные объемы и моменты разбавления можно управлять процессами роста микроводорослей.

3.1. Управляемая культура микроводорослей

Разбавление культуры представляет собой основу управления ростом микроводорослей. Причём управление ростом в культуре может осуществляться только по плотности культуры и времени, что следует из определения кинетических характеристик роста. Действительно, выбирая относительный объем разбавления можно уменьшать плотность культуры до необходимой величины, а, изменяя промежуток времени между разбавлениями, можно повысить плотность до необходимой за счёт роста культуры. Ясно, что регулирование имеет пределы, определяемые внешними условиями и предельными видоспецифическими характеристиками роста микроводорослей.

Если непрерывный рост клеток обеспечивается периодическим разбавлением культуры питательной средой, то такой режим выращивания называют квазинепрерывной проточной культурой. Фактически квазинепрерывная культура включает весь диапазон управляемых культур: от периодической до полностью непрерывной. Существенную роль в динамике плотности квазинепрерывной культуры играет величина относительного разбавления культуры. Эту величину количественно можно оценивать с помощью коэффициента разбавления (разведения, θ):

$$\theta = \frac{\overline{B}_k}{\underline{B}_k},$$

где \overline{B}_k – плотность культуры до разбавления, \underline{B}_k – плотность культуры после разбавления, k – порядковый номер разбавления.

Коэффициент разбавления показывает, во сколько раз разбавлена культура, и может изменяться от 1 (разбавления нет) до бесконечности (культура после разбавления имеет нулевую плотность). Варьируя величину коэффициента разбавления можно уменьшить плотность культуры до заданного уровня. Для разбавления культуры до необходимой плотности необходимо от общего (W_0) объёма суспензии микроводорослей в культиваторе слить часть культуры объёмом w и долить такой же объём питательной среды, т. е. коэффициент разбавления можно выразить через объём культиватора и объём слива:

$$\theta = \frac{W_0}{W_0 - w}.$$

Отсюда, если заданы коэффициент разбавления и общий объём культуры, можно найти объём слива (и долива):

$$w = W_0 - \frac{W_0}{\theta} = W_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) = W_0 \cdot \left(\frac{\theta - 1}{\theta}\right).$$

Разделив объём долива питательной среды на период времени между разбавлениями (Δt) и нормируя относительно объёма культуры, получим удельную скорость протока среды (ω):

$$\omega = \frac{w}{W_0 \cdot \Delta t} = \frac{\theta - 1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}.$$

В промежутке между разбавлениями микроводоросли вырастут. За один промежуток времени между разбавлениями прирост плотности составит:

$$\bar{B}_{k+1} - \underline{B}_k = \bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k,$$

а относительная скорость прироста (скорость, нормированная относительно \bar{B}_k):

$$\mu = \frac{\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k} - \frac{1}{\theta}}{\Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}.$$

Здесь необходимо отметить, что нормировка скорости прироста плотности относительно величины плотности в момент предыдущего разбавления условна и выбрана для удобства.

После разбавления плотность культуры уменьшится на величину:

$$\bar{B}_k - \underline{B}_k = \bar{B}_k - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k = \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) \cdot \bar{B}_k.$$

Разность составит:

$$\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k - \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) \cdot \bar{B}_k = \bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k.$$

Скорость изменения этой разности, нормированная относительно \bar{B}_k , будет равна:

$$\frac{\bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\Delta t} =$$

$$\frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} + \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} = \mu - \omega.$$

Разность прироста и уменьшения плотностей при разбавлении может быть как положительной, так и отрицательной. Если относительная скорость прироста между разбавлениями выше удельной скорости разбавления, то разность будет положительной и перед каждым следующим разбавлением плотность культуры будет выше, чем перед предыдущим, т. е. плотность культуры со временем будет возрастать. Если скорость разбавления будет выше скорости прироста, то плотность культуры будет с течением времени падать.

Таким образом, показано, что динамика плотности квазинепрерывной культуры микроводорослей зависит от соотношения скоростей роста культуры и протока среды. При равенстве скоростей плотность культуры изменяться не будет, т. е. наступит динамическое равновесие (или стационарный режим):

$$\bar{B}_{k+1} = \bar{B}_k = B^{st}.$$

Управление культурой может осуществляться различными способами: либо скорость протока регулируется в зависимости от скорости роста культуры, либо удельная скорость протока задается постоянной. В любом случае удельная скорость протока определяется двумя характеристиками: коэффициентом разбавления и периодом времени между разбавлениями. При этом возникает вопрос о выборе конкретных значений величины удельной скорости протока, которые должны быть в пределах значений удельной скорости роста микроводорослей. Эти пределы определяются видоспецифическими характеристиками роста микроводорослей в данных условиях выращивания: условия освещения, температура, питательная среда, газовая среда, перемешивание и др. Наиболее простой способ оценки характеристик роста – снятие накопительной кривой роста в конкретном культиваторе, которая позволит выбрать пределы, в которых возможно задавать величину плотности и удельной скорости протока.

Рассмотрим динамику плотности культуры в зависимости от способа управления квазинепрерывной проточной культурой.

3.2. Культура с заданной скоростью разбавления

Допустим, произведена оценка характеристик роста периодической культуры микроводорослей в данных условиях, при этом получена динамика роста, показанная штриховой линией на рис. 3.1. Выберем на кривой роста время начала разбавления для I варианта – 12, и для II варианта – 5,5. Оценим относительные скорости прироста плотности в этих точках. Для I варианта плотность в начале разбавления, в момент времени 12, со-

ставляет около 7, а в момент времени 10 плотность была около 5,6, т. е. продуктивность на этом линейном участке роста равна 0,7, а относительная скорость прироста для плотности 7 равна 0,1. Для II варианта в начале разбавления, в момент времени 5,5, плотность примерно равна 2, а для момента времени 2,5 – около 1. Относительная скорость прироста на этом логарифмическом участке примерно равна 0,17, но удельная скорость роста, вычисленная для логарифмической фазы через логарифмы плотностей равна примерно 0,23.

Зададим условия квазинепрерывного процесса: в I варианте будем сливать 25 % суспензии микроводорослей через каждые 3 единицы времени, во II – 40 % культуры через каждые 2 единицы времени, доливая в каждом случае соответствующий объем питательной среды. Фиксированные коэффициенты разбавления θ и время (T_{reg}) между периодическими разбавлениями культуры будут:

$$\begin{aligned} {}_1\theta_{reg} &= 1/0,6; {}_1T_{reg} = 3; \\ {}_2\theta_{reg} &= 1/0,75; {}_2T_{reg} = 2. \end{aligned}$$

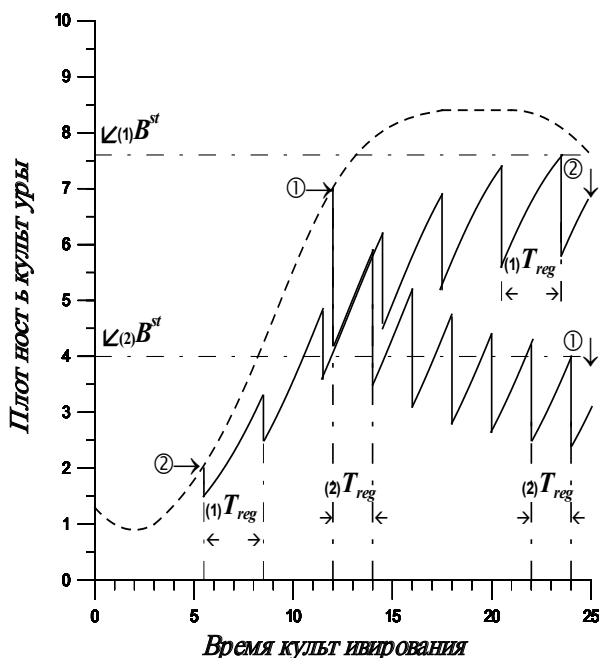


Рисунок 3.1. Динамика плотности квазинепрерывной культуры микроводорослей с заданным протоком среды. ← - вариант 1, ↑ - вариант 2. Коэффициенты разбавления: ${}_1\theta_{reg} = 1/0,6$; ${}_2\theta_{reg} = 4/3$. Периоды: ${}_1T_{reg} = 3$; ${}_2T_{reg} = 2$.

Figure 3.1. Dynamics of density of semicontinuous culture of microalgae are with the given duct of medium. ← - version 1, ↑ - version 2. Dilution coefficients: ${}_1\theta_{reg} = 1/0,6$; ${}_2\theta_{reg} = 4/3$. The terms: ${}_1T_{reg} = 3$; ${}_2T_{reg} = 2$.

Относительные скорости прироста и заданные удельные скорости протока среды:

$$\bar{\mu}_1 = 0,1 < \omega_1 = 0,4/2 = 0,2;$$

$$\bar{\mu}_2 = 0,23 > \omega_2 = 0,25/3 \approx 0,08.$$

В I варианте удельная скорость протока среды выше относительной скорости прироста плотности, поэтому плотность культуры с увеличением числа разбавлений будет уменьшаться, пока относительная скорость прироста не достигнет уровня удельной скорости протока (0,2), и наступит стационарный рост культуры. Причем стационарная плотность должна быть близкой к начальной точке II варианта, где относительная скорость прироста равна 0,23. Во II варианте, наоборот, удельная скорость протока среды ниже относительной скорости прироста плотности, поэтому плотность культуры с увеличением числа разбавлений будет увеличиваться, пока относительная скорость прироста не снизится до уровня удельной скорости протока (0,08), и наступит стационарный рост культуры. В этом случае стационарная плотность должна быть близкой к начальной точке I варианта, где относительная скорость прироста равна 0,1. Наглядно динамика плотности культуры для этих двух вариантов показана на рис. 3.1.

Впервые метод выращивания морских микроводорослей в квазинепрерывной проточной культуре осуществили Кетчум и Редфилд в 1938 г., которые поддерживали активный рост диатомовой водоросли *Nitzschia closterium* за счёт слива определенной части суспензии и замены её таким же объемом питательной среды [Ketchum, Redfield, 1938].

3.3. Хемостат

Если снижать промежуток времени между разбавлениями культуры, уменьшая при этом коэффициент разбавления так, чтобы не изменилась удельная скорость протока, то в пределе мы получим непрерывную культуру, получившую название хемостат. Впервые хемостат для микробиологических процессов был предложен и теоретически обоснован одновременно Моно [Monod, 1950] и Новиком и Сциллардом [Novick, Szilard, 1950].

Хемостат представляет собой систему культивирования, включающую реактор, в который непрерывно подается питательная среда и из которого непрерывно отбирается культура. Скорости подачи среды и отбора культуры должны быть равны, что обеспечивает постоянство объема культуры.

Один из простейших вариантов хемостата с автоматическим поддержанием объема культуры в реакторе изображен на рисунке 3.2. Культиватор для выращивания микроводорослей состоит из освещаемого реактора (фотореактор), который барботируется газо-воздушной смесью, содержащей углекислый газ. Барботаж обеспечивает перемешивание культуры, углеродное питание клеток и отвод кислорода. Из ёмкости с питательной средой, с постоянной заданной скоростью, в реактор поступает среда. Через отверстие в реакторе, расположенное на определенной высоте, культу-

ра непрерывно сливается в ёмкость для сбора урожая. Это обеспечивает при постоянной скорости долива постоянство скорости слива и их равенство. Кроме того, такая система автоматически поддерживает постоянный объем культуры в фотореакторе.

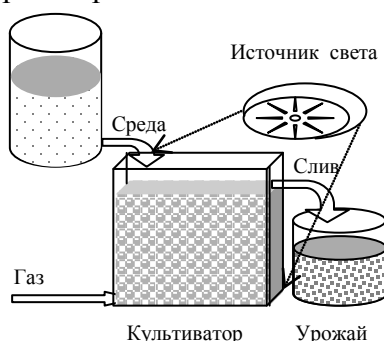


Рисунок 3.2. Система для хемотратных культур
Figure 3.2. System for hemostat cultures

Вернемся к формулам относительного прироста биомассы и удельной скорости потока среды для квазинепрерывного режима выращивания. Удельная скорость потока среды:

$$\omega = \frac{w}{W_0 \cdot \Delta t}.$$

В случае непрерывного потока среды, при скорости потока v , объём долива за промежуток времени Δt составит:

$$w = v \cdot \Delta t,$$

а удельная скорость потока будет равна:

$$\omega = \frac{v \cdot \Delta t}{W_0 \cdot \Delta t} = \frac{v}{W_0}.$$

Относительная скорость прироста биомассы в квазинепрерывной культуре:

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t},$$

а для малых промежутков времени, при малых разбавлениях, разность в плотности между соседними разбавлениями будет также мала:

$$\Delta t \rightarrow 0, \theta \rightarrow 1, \bar{B}_k \rightarrow B$$

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\Delta B}{B \cdot \Delta t},$$

в пределе получим:

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \bar{\mu} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta B}{B \cdot \Delta t} = \frac{dB}{B \cdot dt} = \mu,$$

где B – текущая плотность культуры.

Т. е. с уменьшением коэффициента разбавления и периода между разведениями относительная скорость прироста биомассы в квазинепрерывной культуре будет приближаться к удельной скорости роста. В непрерывной проточной культуре они станут равными.

Непрерывность потока среды через фотореактор позволяет записать балансовое уравнение для динамики плотности непрерывной проточной культуры в дифференциальной форме:

$$\frac{dB}{dt} = \mu \cdot B - \omega \cdot B = (\mu - \omega) \cdot B.$$

Как видно из уравнения, динамика плотности непрерывной культуры зависит от удельной скорости роста, удельной скорости потока и плотности культуры. Но, удельная скорость роста, в свою очередь, зависит от внешних условий, в которых выращиваются клетки и плотности культуры. Зависимость удельной скорости роста от внешних условий представляет собой отдельную проблему, которая в данной работе не рассматривается.

Оценим рост культуры в хемостате для простых случаев, когда имеются некоторые стабильные характеристики роста, и нет необходимости построения сложных моделей. Примем, что у данного культиватора динамика роста биомассы в периодической культуре представляет собой кривую роста, изображенную на рис. 3.1. Время и биомасса выражены в условных единицах. Рост культуры в экспоненциальной фазе характеризуется постоянством удельной скорости роста, а рост на линейном участке – постоянством продуктивности.

Экспоненциальный рост микроводорослей для данной культуры наблюдается на участке времени от 3 до 7, т. е. в районе плотностей от 1 до 3. Этот участок с хорошей точностью описывается экспоненциальным уравнением роста:

$$B = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})},$$

$$B = 1 \cdot e^{0,278 \cdot (t - 3)}, 3 \leq t \leq 7.$$

здесь $t_{ln} = 3$ – момент времени начала логарифмической фазы роста; $B_{ln} = 1$ – плотность культуры в начале логарифмической фазы; $\mu_m = 0,278$ – максимальная удельная скорость культуры в данных условиях (для данного культиватора).

Участок накопительной кривой, рассчитанный по экспоненциальному уравнению роста после подстановки соответствующих величин, показан на рис. 3.3. Там же отмечены координаты начала и конца логарифмической фазы роста.

Плотность культуры в конце экспоненциальной фазы:

$$B^{ln} = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t^{ln} - t_{ln})} = 1 \cdot e^{0,278 \cdot (7 - 3)} = 3,$$

где $t_{ln} = 7$ – момент времени окончания логарифмической фазы.

Продуктивность в начале и конце фазы логарифмического роста:

$$P_{ln} = \mu_m \cdot B_{ln} = 0,278 \cdot 1 = 0,278,$$

$$P^{ln} = \mu_m \cdot B^{ln} = 0,278 \cdot 3 = 0,835.$$

Плотность культуры и продуктивность в начале линейного участка соответствуют плотности и продуктивности в конце экспоненциального участка:

$$B_l = B^{ln} = 3,$$

$$P_l = P^{ln} = \mu_m \cdot B_l = P_m = 0,278 \cdot 3 = 0,835.$$

здесь $P_m = 0,835$ – максимальная продуктивность культуры в данных условиях (для данного культиватора).

Подставляя эти результаты как коэффициенты в уравнение прямой, получим уравнение динамики плотности культуры в линейной фазе роста. Действительно, динамика плотности культуры на линейном участке роста с хорошей точностью описывается уравнением:

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l), t_l \leq t \leq t^l,$$

где $t_l = 7$ и $t_l = 11,5$ – моменты времени начала и окончания линейной фазы роста, соответственно.

Удельная скорость роста на линейном участке будет меняться, от максимальной в начале фазы, до минимальной в конце фазы. Уравнение для удельной скорости роста на этом участке имеет вид:

$$\mu = \frac{P_m}{B} = \frac{P_m}{B_l + P_m \cdot (t - t_l)},$$

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t - t_l)}, t_l \leq t \leq t^l.$$

На рис. 3.3 показана расчётная зависимость для плотности культуры в линейной фазе роста и отмечены координаты начала и конца линейного участка накопительной кривой.

В начале линейной фазы удельная скорость роста будет равна:

$$\mu_l = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t_l - t_l)} = \mu_m = 0,278,$$

что практически совпадает с максимальной удельной скоростью роста, что и следовало ожидать.

Действительно, исходя из условия непрерывности роста, удельная скорость роста в начале линейной фазы должна быть равной скорости в конце логарифмической фазы. В конце линейной фазы роста ($t_l = 11,5$) плотность культуры будет равна:

$$B^l = B_l + P_m \cdot (t^l - t_l) = 3 + 0,835 \cdot (11,5 - 7) = 6,76.$$

Удельная скорость роста в конце линейной фазы роста:

$$\mu^l = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t^l - t_l)} = \frac{0,278}{1 + 0,278 \cdot (11,5 - 7)} = 0,124.$$

Таким образом, определены характеристики роста микроводорослей в логарифмической и линейной фазах роста культуры. Применим эти характеристики для анализа динамики плотности культуры в хемостате.

При логарифмическом росте удельная скорость роста постоянна и не зависит от плотности культуры и дифференциальное уравнение для динамики плотности культуры можно проинтегрировать. Получим уравнение динамики в интегральной форме:

$$\frac{dB}{dt} = (\mu_m - \omega) \cdot B, \frac{dB}{B} = (\mu_m - \omega) \cdot dt,$$

$$\int_{B_0}^B \frac{dB}{B} = (\mu_m - \omega) \cdot \int_{t_0}^t dt,$$

$$\ln \frac{B}{B_0} = (\mu_m - \omega) \cdot (t - t_0),$$

где t_0 и B_0 – время и плотность культуры в момент включения протока, соответственно.

Или:

$$B = B_0 \cdot e^{(\mu_m - \omega) \cdot (t - t_0)}.$$

Максимальная удельная скорость роста является предельной для удельной скорости протока, т. е. область работы хемостата ограничена:

$$\omega \leq \mu_m.$$

Это видно из уравнения динамики плотности: при $\omega > \mu_m$, показатель экспоненты будет отрицательным, и плотность культуры будет со временем уменьшаться до нуля, произойдет вымывание культуры. Причем скорость вымывания культуры будет тем выше, чем выше скорость протока. Два таких случая ($\omega > \mu_m$, $\omega \gg \mu_m$) показаны на рис. 3.3.

При равенстве удельной скорости протока и максимальной удельной скорости роста:

$$B = B_0 \cdot e^{0 \cdot (t - t_0)} = B_0.$$

Теоретически плотность культуры в этом случае будет постоянной, равной начальной плотности в момент включения протока и не должна изменяться со временем. В реальности такой процесс получить очень сложно, т. к. любое случайное изменение плотности приведет к новому стационарному состоянию. Процесс в этом случае будет неустойчивым. Пример стационарного состояния ($\omega = \mu_m$) для логарифмического роста показан на рис. 3.3. При удельной скорости протока ниже максимальной удельной скорости роста динамику плотности нельзя описать полученным ранее интегральным уравнением, т. к. удельная скорость роста будет зависеть от плотности культуры. Допустим, удельная скорость протока задается в пределах удельных скоростей для линейного роста, тогда в дифференциальном уравнении динамики плотности удельную скорость роста можно выразить через плотность культуры, что приведет к другому уравнению динамики плотности:

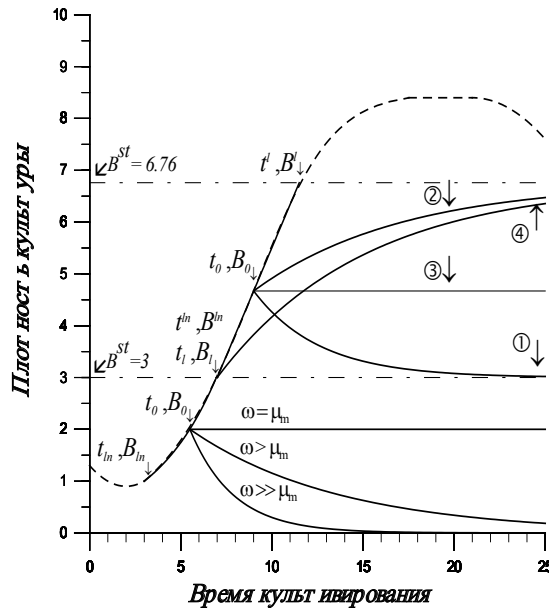


Рисунок 3.3. Динамика плотности культуры микроводорослей в хемостате (пояснения в тексте)

Figure 3.3. Dynamics of microalgae culture density in hemostat (explanations in the text)

$$\mu = \frac{P_m}{B},$$

$$\frac{dB}{dt} = (\mu - \omega) \cdot B,$$

$$\frac{dB}{dt} = \left(\frac{P_m}{B} - \omega \right) \cdot B = P_m - \omega \cdot B = \mu_m \cdot B_l - \omega \cdot B.$$

Разделив переменные и задавая начальные условия, можно найти интегральное выражение для динамики плотности культуры в хемостате (в рамках линейного роста):

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot e^{-\omega(t-t_0)} \quad (3.1)$$

где B_0 – плотность культуры в момент времени включения протока t_0 .

Важнейшим свойством полученной функции является то, что она имеет предел при $t \rightarrow \infty$. На практике это означает, что плотность культуры со временем не будет изменяться и иметь стационарное значение:

$$B^{st} = \lim_{t \rightarrow \infty} B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot e^{-\omega(t-t_0)} = \frac{P_m}{\omega}.$$

Из полученного уравнения следует, что конечное стационарное состояние не зависит от предыстории культуры (t_0, B_0), и определяется только максимальной продуктивностью культуры и удельной скоростью протока среды. Стационарный процесс представляет собой динамическое равновесие между ростом культуры и её выносом с протоком. Причем ди-

намическое равновесие устойчиво, т. к. конечное состояние не зависит от начальной плотности и случайное отклонение от стационарного состояния по плотности приведет к переходному процессу, заданному формулой динамики плотности, а в итоге плотность возвратится к тому же стационарному состоянию. Это утверждение справедливо для данной формулы, относящейся к линейному участку роста. Определим пределы для удельных скоростей протока, при которых будет наблюдаться устойчивое стационарное состояние.

Верхний предел удельной скорости протока определяется максимальной удельной скоростью роста μ_m , которая равна удельной скорости роста в начале линейной фазы. Однако отметим, что при удельной скорости протока, равной максимальной удельной скорости роста, стационарное состояние неустойчиво. Случайное отклонение плотности в сторону уменьшения, приведет культуру в область логарифмического роста. Как следует из формулы динамики плотности для этой области, плотность с течением времени не вернется к исходному состоянию, кроме того, процесс будет неустойчивым. Справедливость формулы для динамики плотности в хемостате на линейном участке роста, можно считать ограниченной величинами удельной скорости протока, которые ниже максимальной удельной скорости роста, и обеспечивающими устойчивый рост ($\omega < \mu_m$).

В конце линейной фазы ($t_l = 11,5$) удельная скорость роста:

$$\mu^l = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t^l - t_l)} = \frac{0,278}{1 + 0,278 \cdot (11,5 - 7)} = 0,124.$$

т. е. удельная скорость протока для линейного роста может задаваться в пределах:

$$0,124 = \mu^l \leq \omega < \mu_m = 0,278.$$

Рассмотрим динамику плотности культуры в хемостате в пределах линейного роста на конкретных примерах. Допустим, в момент времени $t_0 = 9$ периодической культуры, включается проток. Плотность культуры в этот момент составляет:

$$B_0 = B_l + P_m \cdot (t - t_l) = 3 + 0,835 \cdot (9 - 7) = 4,67,$$

а удельная скорость роста:

$$\mu_0 = \frac{P_m}{B_0} = \frac{0,835}{4,67} = 0,179.$$

Зададим 3 значения удельной скорости протока в пределах линейного роста культуры.

$$\omega = \mu_m = 0,278, \quad \omega = \mu^l = 0,124, \quad \omega = \mu_0 = 0,179.$$

Соответствующие уравнения динамики плотности культуры будут описывать переходной процесс от начала включения протока до выхода на стационарный уровень:

$$B = \frac{0,835}{0,278} - \left(\frac{0,835}{0,278} - 4,67 \right) \cdot e^{-0,278 \cdot (t-9)},$$

$$B = \frac{0,835}{0,124} - \left(\frac{0,835}{0,124} - 4,67 \right) \cdot e^{-0,124 \cdot (t-9)},$$

$$B = \frac{0,835}{0,179} - \left(\frac{0,835}{0,179} - 4,67 \right) \cdot e^{-0,179 \cdot (t-9)}.$$

После окончания переходного процесса культура будет иметь стационарные значения плотности:

$$B^{st} = \frac{P_m}{\mu_m} = 3, \quad B^{st} = \frac{P_m}{\mu^I} = 6,76, \quad B^{st} = \frac{P_m}{\mu_0} = 4,67.$$

Покажем независимость стационарной плотности от предыстории культуры на ещё одном примере. Включим проток в момент времени 7 при плотности культуры 3. Удельную скорость протока зададим равной $\mu_I = 0,124$. Тогда уравнение переходного процесса и величина стационарной плотности будут:

$$B = \frac{0,835}{0,124} - \left(\frac{0,835}{0,124} - 3 \right) \cdot e^{-0,124 \cdot (t-7)},$$

$$B^{st} = \frac{P_m}{\mu^I} = 6,76.$$

Как видно из уравнения переходного процесса, с течением времени стационарная плотность достигнет той же величины, что и в примере 2. Графически все 4 примера показаны на рис. 3.3, где номера кривых соответствуют номерам примеров.

3.4. Культура с заданной плотностью. Плотностат

Рассмотрим другой способ управления культурой, когда скорость протока регулируется в зависимости от скорости роста культуры. При этом удельную скорость протока необходимо регулировать таким образом, чтобы она всегда была равной удельной скорости роста. В квазинепрерывной культуре относительная скорость прироста:

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{B_k \cdot \Delta t} - \frac{I}{\theta \cdot \Delta t},$$

а удельная скорость протока:

$$\omega = \frac{I}{\Delta t} - \frac{I}{\theta \cdot \Delta t}.$$

Условие равенства скоростей будет выполняться в случае:

$$\omega = \bar{\mu},$$

$$\frac{I}{\Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t},$$

$$\bar{B}_{k+1} = \bar{B}_k = B^{reg}.$$

Последнее равенство означает, что плотность культуры в момент разбавления должна быть равной плотности культуры в предыдущий момент разбавления. Режим управления по удельной скорости роста можно осуществить, если моменты разбавления подбирать по заданной плотности культуры перед разбавлением (B_{reg}). Т. е. для такого режима необходимо постоянно контролировать плотность культуры.

Удельная скорость потока определяется двумя параметрами: коэффициентом разбавления и периодом времени между разбавлениями. Регулирование можно осуществить либо одним из этих параметров, либо двумя сразу. Последний вариант предполагает непрерывное слежение за скоростью роста культуры и регулирование потока по величине этой скорости. Такой режим управления получил название спидостат и в данной работе не рассматривается.

Другой вариант – когда промежуток времени между разбавлениями задан (T_{reg}), а коэффициент разбавления подбирается таким образом, чтобы плотность после разбавления достигла заданной величины (B_{reg}). Если плотность культуры перед разбавлением (B_{st}), то можно найти коэффициент разбавления для достижения заданной величины (B_{reg}):

$$\theta = \frac{B^{st}}{B_{reg}}.$$

В этом варианте коэффициент разбавления определяется величиной относительной скорости прироста и периодом времени между разбавлениями:

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{I}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{B_{reg} \cdot \theta}{B_{reg} \cdot \theta \cdot T_{reg}} - \frac{I}{\theta \cdot T_{reg}} = \frac{I}{T_{reg}} - \frac{I}{\theta \cdot T_{reg}},$$

$$\theta = \frac{I}{I - \bar{\mu} \cdot T_{reg}}.$$

Плотность культуры перед разбавлением определяется начальной плотностью, относительной скоростью прироста и временем между разбавлениями:

$$B^{st} = \frac{B_{reg}}{I - \bar{\mu} \cdot T_{reg}}.$$

Преимуществом данного варианта управления является возможность дискретного измерения плотности, через заданный промежуток времени, а не постоянного контроля плотности культуры. На рис. 3.4 показан пример управления культуры по заданному периоду времени $T_{reg} = 1$ между измерениями плотности и разбавлением культуры до заданной плотности $B_{reg} = 6$.

В третьем варианте управления плотность культуры контролируется непрерывно в промежутке между разбавлениями. В момент достижения заданной плотности (B_{reg}), культуру разбавляют с заданным коэффициентом (θ_{reg}). Период времени между разбавлениями устанавливается автоматически, в зависимости от относительной скорости прироста культуры. Этот период можно определить из уравнения для относительной скорости прироста культуры:

$$\mu = \frac{\bar{B}_{k+1}}{B_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{B^{reg}}{B^{reg} \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta_{reg} \cdot \Delta t} = \frac{1}{\Delta t} \cdot \frac{\theta_{reg} - 1}{\theta_{reg}},$$

$$\Delta t = \frac{1}{\mu} \cdot \frac{\theta_{reg} - 1}{\theta_{reg}}.$$

Плотность культуры после разбавления:

$$B_{st} = \frac{B^{reg}}{\theta_{reg}}.$$

Наличие системы контроля плотности культуры позволяет подобрать такой режим выращивания микроводорослей, при котором плотность до и после разбавления сблизятся практически до равного уровня. Для этого необходимо снизить коэффициент разбавления и время между разбавлениями до минимально возможных, которые определяются заданной точностью и техническими возможностями системы культивирования. В идеале можно получить непрерывный процесс роста микроводорослей с заданной стабильной плотностью, что позволяет описывать рост простыми дифференциальными уравнениями, аналогичными применяемым для хемостата.

Контроль плотности культуры в строго непрерывном режиме выращивания предполагает использование методов, которые не влияют на рост клеток. Наиболее подходящим можно считать оптический метод оценки плотности культуры. Способ управления ростом культуры при стабилизации оптической плотности на заданном уровне назван турбидостатом (турбидистатом) и впервые был использован для исследования роста микробных популяций [Anderson, 1953; Bryson, 1952; Northrop, 1954].

Одним из принципиальных, и в тоже время очень важных, отличий хемостата и турбидостата является возможность получения в турбидостате устойчивого экспоненциального роста клеток микроводорослей без лимитирования элементами минерального питания (лимитированного только светом или потоком углекислого газа), что невозможно при хемостатном способе культивирования. Т. е. в турбидостате можно исследовать в чистом виде влияние главного фактора, определяющего рост микроводорослей – световые условия, в которых растут клетки. Эти световые условия складываются из внешнего фактора – облученности культуры, и внутреннего – оптических свойств самой культуры.

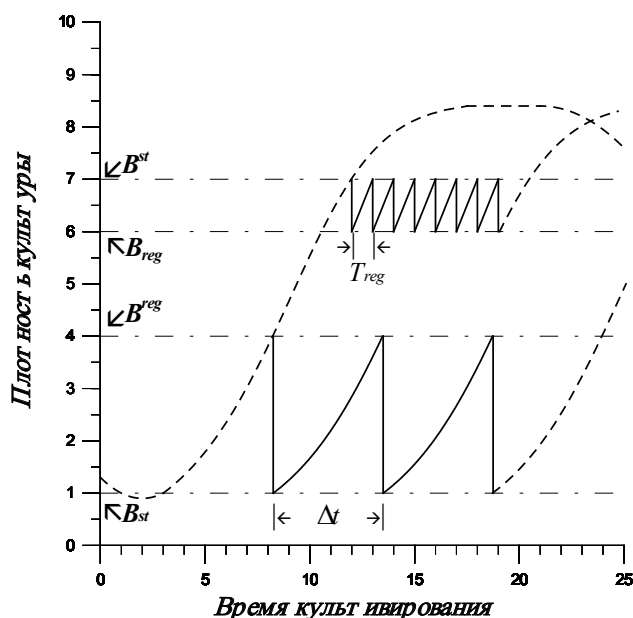


Рисунок 3.4. Динамика роста микроводорослей в квазинепрерывной культуре с заданной плотностью: штриховыми линиями показан рост в периодической культуре (пояснения в тексте)

Figure 3.4. Dynamics of microalgae growth in quasycontinuous culture with the set density: Shaped lines show growth in periodic culture (explanations in the text)

Существенным различием между оптическими свойствами обычной культуры микробов и микроводорослей является высокое содержание пигментов в микроводорослях, которые определяют их оптические свойства в видимой области. Если у неокрашенных микробных клеток оптическая плотность культуры линейно связана с концентрацией клеток и биомассы, то у микроводорослей оптические характеристики целиком определяются пигментами клеток, причем содержание пигментов в клетках варьирует в широких пределах. Поэтому контроль плотности культуры микроводорослей по оптическим характеристикам фактически означает контроль оптической плотности (или пигментного состава клеток), но не биомассы или концентрации клеток. В связи с этим режим управления культурой микроводорослей при заданной оптической плотности получил название плотностат [Терсков, Гительзон, Сидько и др., 1964].

Технически простейший плотностат отличается от хемостата только наличием датчика оптической плотности и исполнительного механизма (дозатора питательной среды), который включается при достижении культурой заданной плотности [Ковров, Буданов, 1964; Штоль, Мельников, Ковров, 1976]. Оптическая система позволяет поддерживать устойчивый режим при разности плотностей до и после разбавления на уровне ниже 1 % от заданной плотности, что позволяет считать динамику плотности практически неизменной и пользоваться дифференциальными уравнениями для её формального описания.

Оба варианта управления с заданной оптической плотностью культуры успешно применяются при исследовании ростовых, продукционных и фотоэнергетических характеристик микроводорослей [Белянин, 1984; Белянин, Сидько, Тренкеншу, 1980]. Такой метод особенно полезен при изучении субстратзависимого роста, т. к. стабилизация оптической плотности позволяет проводить исследования при неизменных световых условиях. Это дает возможность строго контролировать влияние на рост других факторов среды и выделить факторы, даже незначительно влияющие на рост, например, при оптимизации микроэлементного состава питательной среды для морских микроводорослей [Белянин, Тренкеншу, Силкин, 1979; Тренкеншу, Белянин, 1980].

3.5. Моделирование содержания биохимических составляющих в клетках микроводорослей на протоке

В процессе роста культуры микроводорослей происходит изменение содержания отдельных биохимических составляющих. По многочисленным экспериментальным данным [Дробецкая, 2005; Kathiresan, Sarada, Bhattacharya et al., 2006; Fabregas, Garcia, Morales, 1998], при разбавлении плотной культуры микроводорослей происходит изменение световых условий, что приводит к снижению концентрации пигментов и фикобилипротеинов. В процессе роста увеличивается плотность суспензии, ухудшаются световые условия, и происходит накопление пигментов. Имеются сведения, что при лимитировании роста водорослей минеральным азотом происходит деградация фикобилиновых пигментов и общего белка в целом [Гудвиллович, Лелеков, 2008; Минюк, Дробецкая, Тренкеншу и др., 2002; Fresnedo, Serra, 1992]. Таким образом, биохимический состав клеток микроводорослей является индикатором внешних условий, поэтому при исследованиях подобных процессов необходимо уметь прогнозировать динамику содержания биохимических компонентов.

Если считать, что культура не выходит за границы линейной фазы роста, тогда динамика биомассы будет подчиняться уравнению (3.1):

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_i \right) \cdot e^{-\omega \cdot (t - t_i)},$$

С учётом того, что любой биохимический компонент является частью биомассы и может быть выражен через величину относительного содержания β , динамика концентрации данного компонента в среде будет также подчиняться уравнению (3.1). Например, для концентрации белка P получим:

$$P = \frac{\rho_m}{\omega} - \left(\frac{\rho_m}{\omega} - P_0 \right) \cdot e^{-\omega \cdot (t - t_0)}, \quad (3.2)$$

где ρ_m – максимальная продукция белка, P_0 – концентрация белка в момент включения протока t_0 .

Учитывая (3.1) и (3.2), теоретическую кривую динамики относительного содержания белка в биомассе можно записать в виде:

$$\beta = \frac{\frac{P_m}{\omega} - (\frac{P_m}{\omega} - P_0) \cdot e^{-\omega \cdot (t-t_0)}}{\frac{P_m}{\omega} - (\frac{P_m}{\omega} - B_0) \cdot e^{-\omega \cdot (t-t_0)}} \cdot 100\%. \quad (3.3)$$

Полученная зависимость позволяет прогнозировать содержание белка в биомассе в произвольный момент времени на этапе квазинепрерывной культуры (расчёт кинетических характеристик белка и биомассы производится на линейной фазе роста накопительной культуры). Также уравнение (3.3) позволяет решать и обратную задачу – аппроксимация экспериментальных данных позволит определить удельную скорость потока системы или ростовые характеристики культуры.

Приведём примеры использования уравнения (3.3) при описании динамики роста культуры *D. salina* и содержания хлорофилла а и белка. Объектом исследования являлась галобная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. из коллекции культур ИМБИ РАН г. Севастополь. Использовалась питательная среда следующего состава: сухая морская соль – 120 г/л; $NaNO_3$ – 1,8 г/л; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,3 г/л; Na_2EDTA – 0,037 г/л; $FeC_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$ – 0,042 г/л; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,008 г/л; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,00625 г/л; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 0,00183 г/л; $K_2Cr_2(SO_4)_2 \cdot 24H_2O$ – 0,00238 г/л. Использовались стеклянные культиваторы плоскопараллельного типа. Эксперимент проводился в пяти параллельных вариантах (далее варианты А, В, С, D, Е). Объём суспензии в каждом культиваторе равнялся 5 л. Культура барботировалась газовоздушной смесью с добавлением 3 % углекислоты. Освещенность на поверхности культур составляла в среднем 21 клк, температура суспензии поддерживалась в диапазоне от 26 до 28 °С. Для определения абсолютно сухого веса (АСВ) величину оптической плотности D_{750} умножали на коэффициент 0,78 [Геворгиз, Боровков, 2005]. Для определения органического вещества (ОВ) величину АСВ умножали на $1-k$, где k – зольность, которая составляла 27 %. На начальном этапе эксперимента культуру выращивали накопительным методом. На тринадцатые сутки эксперимента культуру перевели в квазинепрерывный режим культивирования. Для каждого культиватора удельную скорость потока ω : для варианта А – $\omega = 0,12 \text{ сут}^{-1}$, для варианта В – $\omega = 0,14 \text{ сут}^{-1}$, для варианта С – $\omega = 0,32 \text{ сут}^{-1}$, для варианта D – $\omega = 0,42 \text{ сут}^{-1}$, у варианта Е разбавление не проводили.

На рис. 3.5 представлена усреднённая по пяти культиваторам накопительная кривая роста культуры *D. salina*. Продолжительностью экспоненциальной фазы будем считать промежуток времени с момента начала эксперимента по четвертые сутки. На данном этапе динамика роста культуры описывается уравнением (2.1):

$$B = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})},$$

где μ_m – максимальная удельная скорость роста, которая определяется внешними световыми условиями, B_{ln} – биомасса в начале лог-фазы t_{ln} .

Для нашего случая значение $B_{ln} = 0,11$ г ОВ/л, а экспоненциальная фаза роста культуры началась с момента начала эксперимента суток, таким образом $t_{ln} = 0$. Получим уравнение роста культуры на данной фазе:

$$B = 0,11 \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Аппроксимация участка накопительной кривой данным уравнением с нулевого по четвертый день позволит определить величину μ_m .

Продолжительностью фазы линейного роста будем считать промежуток времени с четвертых по девятые сутки эксперимента. На данном этапе динамика роста культуры описывается уравнением (2.2):

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l),$$

где P_m – максимальная продуктивность, которая определяется внешними газовым потоком, B_l – биомасса в начале фазы t_l .

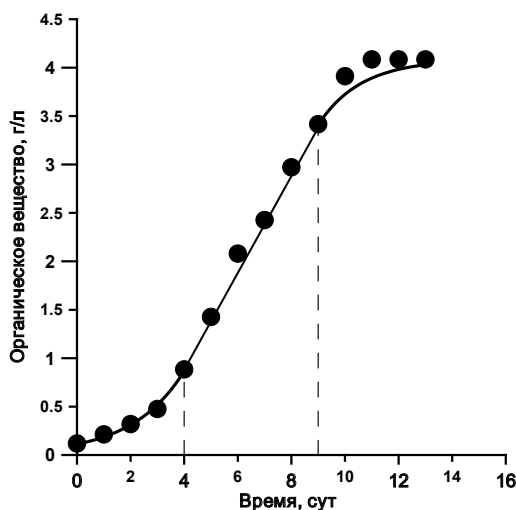


Рисунок 3.5. Накопительная кривая *D. salina*. Пунктиром отмечены границы фаз роста. Линии – аппроксимация фаз роста уравнениями (2.1, 2.2, 2.4). Значения коэффициентов в табл. 3.1

Figure 3.5. The batch curve of *D. salina*. Dashed line marks the border of the growth phases. Lines – approximation of the growth phases by equations (2.1, 2.2, 2.4). The values of the coefficients in the table 3.1

Для нашего случая значение $B_l = 0,44$ г ОВ/л, а фаза линейного роста культуры началась с четвертых суток, таким образом $t_l = 4$. Получим уравнение роста культуры на данной фазе:

$$B = 0,44 + P_m \cdot (t - 4).$$

Аппроксимация участка накопительной кривой с четвертого по девятый день позволит определить величину P_m .

Фаза отмирания продолжалась с девярых по двенадцатые сутки, в конце которой культура вышла на стационар и плотность составила 4,08 г ОВ/л. Уравнение, описывающее динамику биомассы на этой фазе записывается в виде (2.4):

$$B = B_m - (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^l)},$$

где μ_r – удельная скорость темнового дыхания, B_m – плотность культуры на стационарной фазе, B^l – плотность культуры в конце линейной фазы в момент времени t^l .

Максимальное значение плотности культуры составляет $B_m = 4,08$, $B^l = 3,41$ г ОВ/л, а фаза замедления началась с девярых суток, таким образом $t^l = 9$. Получим уравнение роста культуры на данной фазе:

$$B = 4,08 - (4,08 - 3,41) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - 9)}.$$

Аппроксимация участка накопительной кривой на фазе замедления позволит определить величину μ_r . Значения ростовых характеристик культуры представлены в табл. 3.1.

По литературным данным [Боровков, 2008] величина удельной скорости роста *D. salina* в лабораторных условиях может достигать значения 10 сут^{-1} , хотя в природных популяциях такие высокие скорости роста представлены крайне редко вследствие лимитирования роста микроводорослей нехваткой биогенов или световой энергии. Полученное нами значение μ_m свидетельствует об ограничении роста дуналиеллы световой энергией.

Таблица 3.1. Кинетические параметры роста накопительной культуры *D. salina*
Table 2.1. The kinetic parameters of growth of the *D. salina* batch culture

μ_m , сут ⁻¹	P_m , г ОВ /л · сут	μ_r , сут ⁻¹
0,51	0,50	1,47

Динамика хлорофилла а и общего белка культуры D. salina. Параллельно с измерением биомассы *D. salina* проводились измерения содержания хлорофилла а и общего белка. Во всех опытных образцах динамика содержания хлорофилла а культуры *D. salina* на накопительном этапе (по тринадцатые сутки эксперимента) имеет типичную S-образную форму, начальная плотность составляла около 0,67 мг/л суспензии (рис. 3.6). На пятые сутки эксперимента наблюдалась линейная фаза роста, которая продолжалась по девярые сутки. Аппроксимация этой фазы линейной зависимостью позволяет рассчитать величину максимальной продуктивности для хлорофилла а $\rho_m^{chl a}$, которая в среднем между вариантами составляла 11,2 мг/сут · л. Далее следовала фаза замедления роста, и содержание хлорофилла а на стационарной фазе достигала уровня 76 – 80 мг ОВ/л. На квазине-

прерывном этапе плотность культуры падала, и достигала стационарного динамического равновесия в зависимости от заданных скоростей потока.

Полученное значение максимальной продуктивности хлорофилла $\rho_m^{chl a}$ и биомассы P_m подставим в уравнение (3.2). В результате получим прогностическую кривую динамики содержания хлорофилла а на квазине-прерывном этапе. Соответствие экспериментальных данных с теорией представлено на рис. 3.6.

Используя (3.3) и рассчитанные значения максимальных продуктивностей по биомассе и хлорофиллу, получим прогностическую зависимость процентного содержания хлорофилла на этапе непрерывной культуры:

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{\rho_m}{P_m} - (\frac{\rho_m}{P_m} - \pi_0) \cdot e^{-\omega t}}{\frac{\rho_m}{P_m} - (\frac{\rho_m}{P_m} - B_0) \cdot e^{-\omega t}}.$$

Для варианта А получим следующую зависимость: (удельная скорость потока $\omega = 0,12$, начальная концентрация хлорофилла $\pi_0 = 72,97$, плотность культуры составляет $B_0 = 4,01$, максимальная продуктивность по биомассе $P_m = 0,49$, по хлорофиллу – $\rho_m^{chl a} = 11,4$):

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{11,4}{0,49} - (\frac{11,4}{0,49} - 72,97) \cdot e^{-0,12 \cdot (t-13)}}{\frac{11,4}{0,49} - (\frac{11,4}{0,49} - 4,01) \cdot e^{-0,12 \cdot (t-13)}}.$$

Для варианта В имеем следующие начальные условия – удельная скорость потока $\omega = 0,14$, начальная концентрация хлорофилла $\pi_0 = 72,24$, плотность культуры составляет $B_0 = 4,16$, максимальная продуктивность по биомассе $P_m = 0,5$, по хлорофиллу – $\rho_m^{chl a} = 11,6$):

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{11,6}{0,5} - (\frac{11,6}{0,5} - 72,24) \cdot e^{-0,14 \cdot (t-13)}}{\frac{11,6}{0,5} - (\frac{11,6}{0,5} - 4,16) \cdot e^{-0,14 \cdot (t-13)}}.$$

Для варианта С – удельная скорость потока $\omega = 0,32$, начальная концентрация хлорофилла $\pi_0 = 75,84$, плотность культуры составляет $B_0 = 4,16$, максимальная продуктивность по биомассе $P_m = 0,5$, по хлорофиллу – $\rho_m^{chl a} = 10,8$):

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{10,8}{0,5} - (\frac{10,8}{0,5} - 75,84) \cdot e^{-0,32 \cdot (t-13)}}{\frac{10,8}{0,5} - (\frac{10,8}{0,5} - 4,16) \cdot e^{-0,32 \cdot (t-13)}}.$$

Для варианта D – удельная скорость потока $\omega = 0,42$, начальная концентрация хлорофилла $\pi_0 = 76,88$, плотность культуры составляет

$B_0 = 4,01$, максимальная продуктивность по биомассе $P_m = 0,48$, по хлорофиллу – $\rho_m^{chl a} = 10,4$):

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{10,4}{0,42} - (\frac{10,4}{0,42} - 76,88) \cdot e^{-0,42 \cdot (t-13)}}{\frac{0,48}{0,42} - (\frac{0,48}{0,42} - 4,01) \cdot e^{-0,42 \cdot (t-13)}}$$

Полученные теоретические кривые представлены на рис. 3.7.

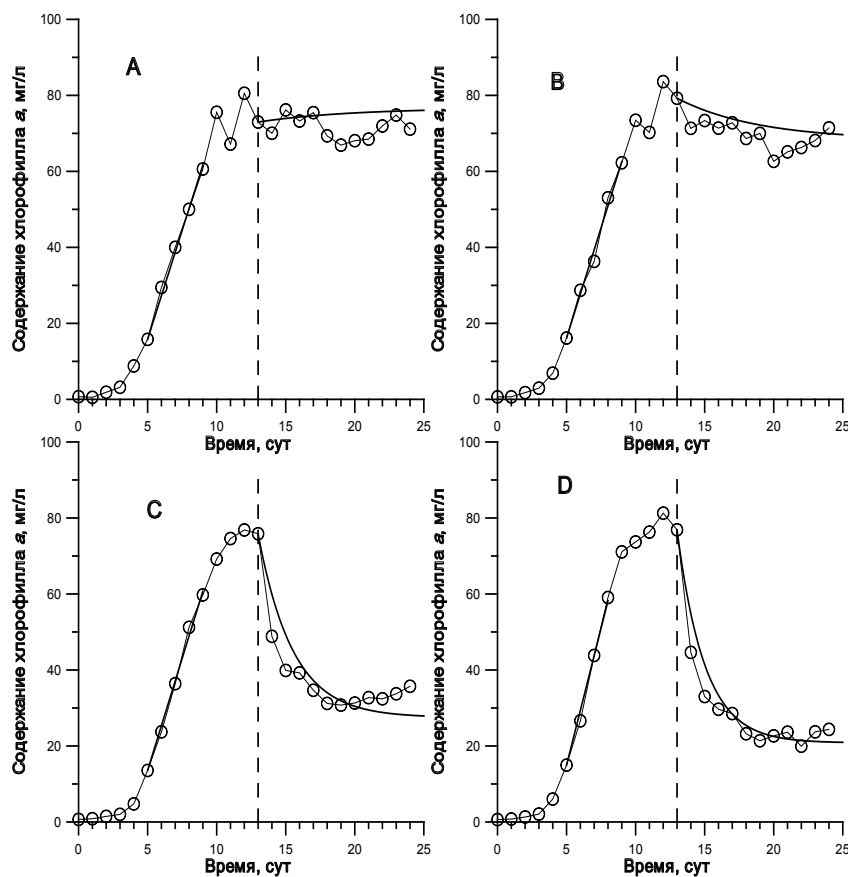


Рис. 3.6. Динамика хлорофилла а культуры *D. salina*. Аппроксимация линейной фазы уравнением (2.2). Пунктирная линия – момент включения протока. Соответствие теоретических кривых по уравнению (3.3) и экспериментальных данных на этапе квазинепрерывной культуры для различных скоростей протока (варианты А – D)

Fig. 3.6. Dynamics of chlorophyll a *D. salina* culture. Approximation of the linear phase equation (2.2). Dotted line – the time of duct switching. The theoretical curves according to equation (3.3) and the experimental data at the stage semicontinuous culture for various duct rates (variants A – D)

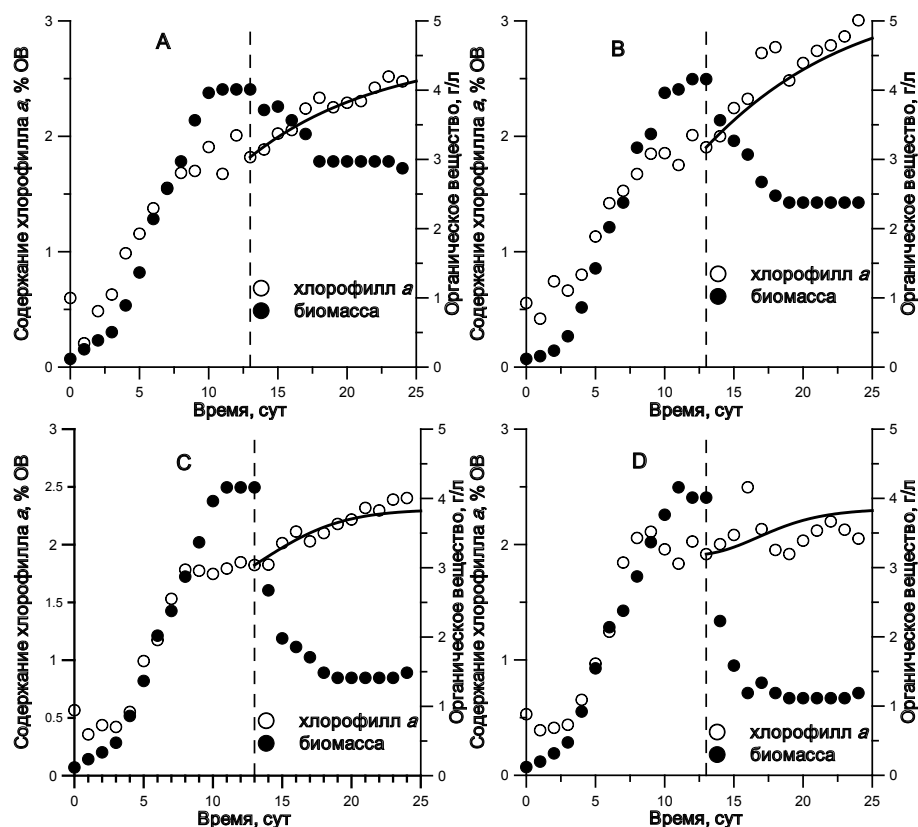


Рисунок 3.7. Динамика относительного содержания хлорофилла а культуры *D. salina*. Пунктирная линия – момент включения протока. Соответствие теоретических кривых и экспериментальных данных на этапе квазинепрерывной культуры для различных скоростей протока (варианты А – D)

Figure 3.7. The dynamics of the relative content chlorophyll a *D. salina* culture. Dotted line – the time of switching the duct. The correspondence between theoretical curves and experimental data at the stage semicontinuous culture for various duct rates (variants A – D)

ГЛАВА 4

Модель потребления элементов минерального питания микроводорослями

Введённые кинетические характеристики позволяют описать динамику роста культуры микроводорослей как на каждой фазе роста по отдельности, так и всю накопительную кривую в целом. Далее возникает необходимость количественной оценки влияния того или иного биогенного элемента на рост культуры. Подобная задача приводит к понятию "потребности" микроводорослей в субстрате. В литературе [Ризниченко, Рубин, 1993; Рубин, 2002] это понятие получило название "экономический коэффициент", которое определяется как количество биомассы синтезируемой B_S за счёт единицы субстрата S :

$$Y = -\frac{dB_S}{dS}. \quad (4.1)$$

Имеются сведения, что в некоторых случаях при моделировании субстратзависимого роста микроводорослей авторы [Гуревич, 1984; Левич, 1989] используют понятие потребность, которая равна отношению количества потребленного субстрата dS к синтезируемой за счет этого субстрата биомассе (dB_S):

$$Y_S^0 = \frac{1}{Y} = -\frac{dS}{dB_S}. \quad (4.2)$$

Здесь знак "минус" отражает противоположную направленность изменений концентраций субстрата и биомассы. Для небольших изменений субстрата и биомассы бесконечно малые приращения мы можем записать как конечные, что позволяет по экспериментальным данным рассчитать величину потребности:

$$Y_S^0 = -\frac{\Delta S}{\Delta B_S}.$$

В отличие от клеточной квоты Друппа [Droop, 1970] потребность культуры микроводорослей в субстрате не является содержанием этого элемента в клетках, а является некоторой физиологической нормой, которая показывает какое количество субстрата, необходимо для синтеза единицы биомассы. В зависимости от условий среды потребность изменяется, в то время как минимальная квота Друппа есть величина постоянная.

Используя введённые кинетические характеристики роста, получим уравнения динамики субстрата для различных фаз роста накопительной культуры, где параметром содержания минерального элемента в биомассе является величина потребности. В отличие от модели Друппа [Droop, 1970],

в которой описывается зависимость удельной скорости роста от внутриклеточной концентрации лимитирующего субстрата для всей накопительной кривой, разбиение на фазы роста значительно упрощает математические расчёты, а также позволяет прогнозировать динамику концентрации субстрата в среде в условиях непрерывной культуры при известных кинетических характеристиках роста.

В общем случае, рост и биосинтез компонентов клетки является результатом двух процессов: собственно фотосинтеза и дыхания:

$$P_r = \mu_r \cdot B,$$

где μ_r – удельная скорость дыхания; P_r – скорость дыхания (количество биомассы, распадающейся в единицу времени).

Наблюдаемая скорость роста P будет равна разности скоростей "чистого" фотосинтеза и дыхания:

$$P = P_0 - P_r = \frac{dB_s}{dt} - \frac{dB_r}{dt} = \frac{1}{dt} \cdot (dB_s - dB_r) = \frac{dB}{dt}$$

Следовательно, выражение для потребности преобразуется к виду:

$$Y_s = -\frac{dS}{dB}, \quad (4.3)$$

Таким образом, мы получили две величины, характеризующие потребность культуры в субстрате: наблюдаемая Y_s и истинная Y_s^0 . Очевидно, что в процессе роста культуры микроводорослей величина синтезированной биомассы dB_s остаётся постоянной (мы говорим о лимитированном росте). В тоже время величина прироста плотности dB уменьшается за счет процессов дыхания. Таким образом, значение истинной потребности остается константой, а наблюдаемой – будет увеличиваться со временем.

4.1. Общий случай субстратного обмена

В процессе роста клетка непрерывно выделяет метаболиты в среду. Распад биомассы за счёт дыхания культуры приводит к снижению скорости роста и увеличению потребности. При этом распавшаяся биомасса посредством её минерализации служит источником минерального питания. Минеральные элементы могут либо повторно использоваться в биосинтезе, либо безвозвратно теряться, переходя в нерастворимые соединения, которые не могут быть задействованы биосинтетическим аппаратом клетки. Также возможен вариант, когда только часть минерализованного субстрата повторно вовлекается в биосинтез.

Оценим скорость возвращения субстрата dS_r/dt . Очевидно, что эта величина будет прямопропорциональна количеству распавшейся за счёт дыхания биомассы, а, следовательно, для скоростей справедливо равенство:

$$\frac{dS_r}{dt} = \alpha \cdot Y_S^0 \cdot \frac{dB_r}{dt},$$

где α – безразмерный коэффициент возврата субстрата в биосинтетические процессы.

В работе [Ширяев, 2007] рассчитаны величины удельной скорости дыхания и коэффициента возврата субстрата для культуры дуналиеллы *D. salina* по приведённым ранее экспериментальным данным (см. раздел 2.2). Автором построена модель роста культуры микроводорослей в зависимости от концентрации субстрата в среде. Удельная скорость роста от концентрации лимитирующего субстрата задается ломаной Блэкмана. Получена система уравнений и найдено её численное решение. Результаты расчётов показали, что коэффициент α составляет 11 %, а удельная скорость дыхания дуналиеллы составляет $0,05 \text{ сут}^{-1}$.

Скорость распада биомассы равна произведению удельной скорости дыхания μ_r на саму биомассу B , получим:

$$\frac{dS_r}{dt} = \alpha \cdot Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot B. \quad (4.4)$$

Итак, балансовое уравнение для динамики субстрата имеет вид:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_S^0 \cdot \frac{dB_S}{dt} + \frac{dS_r}{dt}. \quad (4.5)$$

Оно отображает, что концентрация субстрата падает за счёт расхода на синтез биомассы и одновременно происходит возврат субстрата из распавшейся биомассы. Используя (4.4), найдём выражение для наблюдаемой потребности, предварительно преобразовав уравнение (4.5):

$$\begin{aligned} \frac{dB_S}{dt} &= \mu_0 \cdot B, \\ \frac{dS}{dt} &= -Y_S^0 \cdot \mu_0 \cdot B + \alpha \cdot Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot B, \\ \frac{dS}{dt} &= (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \cdot Y_S^0 \cdot B. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Подставляя выражение (4.6) в выражение (4.3), получим:

$$Y_S = Y_S^0 \cdot \frac{\mu_0 - \alpha \cdot \mu_r}{\mu}. \quad (4.7)$$

Учитывая, что удельная скорость биосинтеза μ_0 есть сумма удельных скоростей роста μ и дыхания μ_r , получим:

$$Y_S = Y_S^0 \cdot \frac{\mu + \mu_r \cdot (1 - \alpha)}{\mu}. \quad (4.8)$$

Анализируя выражение (4.8), можно рассмотреть следующие крайние случаи:

1. Происходит полное возвращение субстрата в среду, т. е. $\alpha = 1$. Потерь субстрата за счет дыхания не будет, а наблюдаемая и истинная потребности будут равны.

2. Субстрат не возвращается в среду, т. е. $\alpha = 0$. В этом случае наблюдаемая потребность будет выше истинной, так как происходит потеря субстрата, а единица биомассы не образуется:

$$Y_S = Y_S^0 \cdot \frac{\mu + \mu_r}{\mu}.$$

4.2. Расчёт величины потребности для различных фаз роста

Экспоненциальная фаза характеризуется постоянством удельной скорости роста, причем здесь эта величина максимальна и равна μ_m . Уравнение роста культуры в дифференциальной форме имеет вид:

$$\frac{dB}{dt} = \mu_m \cdot B = (\mu_0 - \mu_r) \cdot B.$$

Скорость синтеза биомассы определяется как:

$$\frac{dB_S}{dt} = \mu_0 \cdot B.$$

Преобразуем уравнение (4.8):

$$\frac{Y_S^0}{Y_S} = \frac{\frac{dB}{dt}}{\frac{dB_S}{dt}} = \frac{(\mu_0 - \mu_r) \cdot B}{\mu_0 \cdot B} = \frac{\mu_0 - \mu_r}{\mu_0}.$$

Т. е. истинная потребность определяется отношением удельных скоростей роста и биосинтеза:

$$Y_S^0 = Y_S \cdot \frac{\mu_m}{\mu_0}.$$

Разделим левую и правую часть на отношение удельных скоростей:

$$Y_S = Y_S^0 \cdot \frac{\mu_0}{\mu_m}.$$

Теперь мы можем получить зависимость ассимиляции субстрата от времени. Учитывая (4.3), запишем для экспоненциальной фазы:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_S^0 \cdot \mu_0 \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Интегрируя последнее выражение при начальных условиях $S = S_0$ при $t = 0$, получим:

$$S = S_0 - Y_S^0 \cdot \frac{\mu_0}{\mu_m} \cdot B_0 - Y_S^0 \cdot \frac{\mu_0}{\mu_m} \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

или

$$S = S_0 - Y_S^0 \cdot \frac{\mu_0}{\mu_m} \cdot B_0 \cdot (1 + e^{\mu_m \cdot t}).$$

Запишем максимальную удельную скорость биосинтеза как сумму удельных скоростей роста и дыхания: $\mu_0 = \mu + \mu_r$. Тогда окончательное вы-

ражение для динамики субстрата на экспоненциальной фазе записывается в следующем виде:

$$S = S_0 - Y_S^0 \cdot \frac{\mu_m + \mu_r}{\mu_m} \cdot B_0 \cdot (1 + e^{\mu_m \cdot t}). \quad (4.9)$$

Аппроксимация экспериментальных данных на экспоненциальной фазе роста уравнением (4.9) позволит рассчитать значение истинной потребности Y_S^0 . Для этого введем следующие обозначения:

$$\begin{cases} a = S_0 - Y_S^0 \cdot \frac{\mu_m + \mu_r}{\mu_m} \cdot B_0, \\ b = Y_S^0 \cdot \frac{\mu_m + \mu_r}{\mu_m} \cdot B_0. \end{cases}$$

Уравнение (4.9) отражает изменение концентрации субстрата в среде при условии экспоненциального роста культуры микроводорослей. При известных кинетических характеристиках роста (максимальной удельной скорости роста и удельной скорости дыхания) и начальных условиях (B_0 и S_0) можно прогнозировать динамику концентрации субстрата в среде. На рис. 2А представлено семейство кривых, рассчитанных по уравнению (4.9) при различных значениях действительной потребности (значения коэффициентов – $S_0 = 440$ мг/л, $\mu_m = 0,5$ сут⁻¹, $\mu_r = 0,1$ сут⁻¹). Очевидно, что форма кривых обуславливается ростовыми характеристиками культуры. Таким образом, аппроксимация реальных экспериментальных данных уравнением (4.9) позволит определить величину действительной потребности.

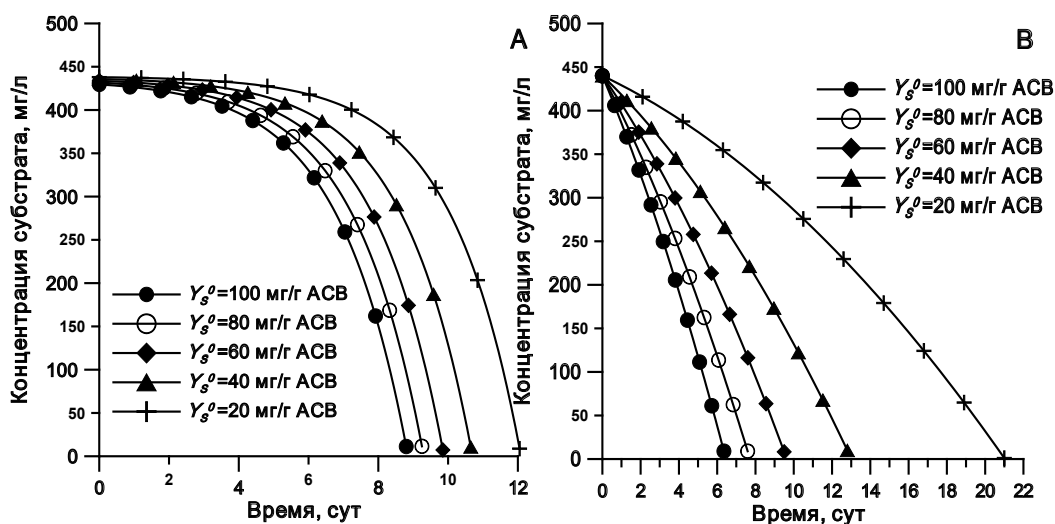


Рисунок 4.1. Семейство кривых, построенных по уравнению (4.9) (А) и уравнению (4.11) (В) для различных значений истинной потребности

Figure 4.1. The family of curves constructed from equation (4.9) (A) and equation (4.11) (B) for different values of real economic coefficient

Линейная фаза роста. Линейная фаза роста характеризуется постоянством продуктивности культуры ($P_m = const$):

$$\mu = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt} = \frac{P_m}{B}.$$

Полученную величину подставим в выражение (4.8):

$$Y_S = Y_S^0 \cdot \left(1 + \frac{(1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot B}{P_m} \right).$$

На данной фазе биомасса растет по линейному закону (2.2):

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l),$$

где B_l – величина биомассы в момент начала линейного роста t_l .

В этом случае уравнение (4.8) преобразуется к следующему виду:

$$Y_S = Y_S^0 \cdot \left(1 + (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot \frac{B_l + P_m \cdot (t - t_l)}{P_m} \right).$$

Стоит отметить, что наблюдаемая потребность линейно зависит от времени культивирования. Используя предложенные выше модельные представления, в рамках линейной фазы роста культуры, мы можем получить зависимость ассимиляции субстрата от времени. Учитывая (4.3), запишем:

$$Y_S = -\frac{dS}{dB} = -\frac{\frac{dS}{dt}}{\frac{dB}{dt}} = -\frac{\frac{dS}{dt}}{P_m} = Y_S^0 \cdot \left(1 + (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot \frac{B_l + P_m \cdot (t - t_l)}{P_m} \right).$$

Полагая $t_l = 0$ и перенося P_m в правую часть, получаем дифференциальное уравнение ассимиляции субстрата, интегрирование которого при заданных начальных условиях даст нам искомую функцию:

$$\frac{dS}{dt} = -P_m \cdot Y_S^0 \cdot \left(1 + (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot \frac{B_l + P_m \cdot t}{P_m} \right).$$

Разделим переменные, раскроем скобки и перегруппируем слагаемые:

$$dS = -P_m \cdot Y_S^0 \cdot dt - Y_S^0 \cdot (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot (B_l + P_m \cdot t) \cdot dt,$$

$$dS = -Y_S^0 \cdot (P_m + (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot B_l) dt - Y_S^0 \cdot (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot P_m \cdot t \cdot dt.$$

Последнее уравнение проинтегрируем при начальных условиях $S = S_0$ при $t = t_l$:

$$\int_{S_0}^S dS = -Y_S^0 \cdot (P_m + (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot B_l) \int_{t_l}^t dt - Y_S^0 \cdot (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot P_m \int_{t_l}^t t \cdot dt,$$

$$S - S_0 = -Y_S^0 \cdot (P_m + (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot B_l) \cdot (t - t_l) - \frac{1}{2} \cdot Y_S^0 \cdot (1-\alpha) \cdot \mu_r \cdot P_m \cdot (t - t_l)^2.$$

Переноса S_0 в правую часть, получаем искомую зависимость ассимиляции субстрата от времени в рамках линейной фазы роста культуры:

$$S = S_0 - Y_S^0 \cdot (P_m + (1 - \alpha) \cdot \mu_r \cdot B_l) \cdot (t - t_l) - \frac{1}{2} \cdot Y_S^0 \cdot (1 - \alpha) \cdot \mu_r \cdot P_m \cdot (t - t_l)^2.$$

Рассмотрим крайние случаи:

1. Происходит полное возвращение субстрата в среду, $\alpha = 1$. Получаем линейную зависимость для динамики субстрата от времени. Угол наклона прямой к оси абсцисс равняется произведению максимальной продуктивности культуры P_m на истинную потребность, что даёт возможность для её оценки:

$$S = S_0 - Y_S^0 \cdot P_m \cdot (t - t_l). \quad (4.10)$$

2. Субстрат не возвращается в среду, $\alpha = 0$:

$$S = S_0 - Y_S^0 \cdot (P_m + \mu_r \cdot B_l) \cdot (t - t_l) - \frac{1}{2} \cdot Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot P_m \cdot (t - t_l)^2, \\ S = S_0 - a \cdot t - b \cdot t^2, \quad (4.11)$$

где $a = Y_S^0 \cdot (P_m + \mu_r \cdot B_l)$, $b = \frac{1}{2} \cdot Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot P_m$.

Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (4.11) при $t_l = 0$ позволяет рассчитать величины удельной скорости дыхания и истинной потребности. Для этого решаем систему, подставляя полученные при аппроксимации значения обобщённых коэффициентов.

$$\begin{cases} a = Y_S^0 \cdot (P_m + \mu_r \cdot B_l), \\ b = \frac{1}{2} \cdot Y_S^0 \cdot \mu_r \cdot P_m. \end{cases}$$

Рассмотрим экспериментальные данные работы [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001] по выращиванию культуры *S. platensis* при различных условиях минерального обеспечения. Авторы приводят накопительные кривые плотности культуры, а также динамику потребления нитратного азота (рис. 4.2 и 4.3).

Используя полученные в предыдущем разделе теоретические уравнения, рассчитаем величины кинетических характеристик культуры, а также истинную потребность *S. platensis* в азоте. Из-за того, что начальная плотность культуры была достаточно высокая (0,18 г АСВ/л), экспоненциальная фаза роста культуры отсутствует. Расчет P_m аппроксимацией линейной фазы накопительных кривых уравнением:

$$B = 0,18 + P_m \cdot t,$$

представлен на рис. 4.2 и табл. 4.1. Удельную скорость дыхания культуры μ_r определим аппроксимацией фазы замедления роста, которая продолжалась с восьмых по двенадцатые сутки. Для вариантов А, В и С соответственно уравнение динамики плотности культуры запишется в виде:

$$B = 1,26 + (1,26 - 0,94) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-8)},$$

$$B = 1,17 + (1,17 - 1,03) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-8)},$$

$$B = 0,98 + (0,98 - 0,77) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-8)}.$$

Аппроксимация фазы замедления уравнением (2.4) позволит определить величину μ_r . Результаты представлены на рис. 4.2 и в табл. 4.1.

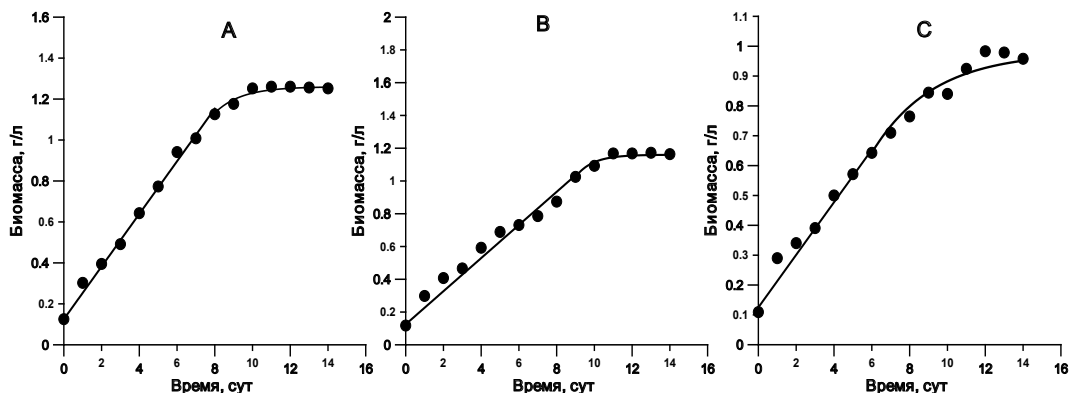


Рисунок 4.2. Накопительные кривые роста *S. platensis*. А – полная среда Заррук, В – разведение 1:1, С – разведение 1:3. Аппроксимация линейной фазы уравнением (2.2), фазы замедления – уравнением (2.4). Значения коэффициентов в табл. 4.1.

Figure 4.2. The batch curves of *S. platensis*. A – full Zarruk medium, B – dilution 1:1, C – dilution 1:3. Approximation of linear faze by equation (2.2). The value of coefficient in table 4.1

Таблица 4.1. Характеристики роста накопительной культуры *S. platensis*

Table 4.1. Growth characteristics *S. platensis* batch culture

Разведение среды	P_m , г/л·сут ⁻¹	μ_r , сут ⁻¹	Y_s^0 , мг N/г АСВ
Полная среда	0,13	0,47	140,47
1:1	0,10	0,46	138,63
1:3	0,09	0,43	110,23

Полученные величины максимальной продуктивности культуры *S. platensis* выше, чем рассчитанные авторами работы [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001]. Это можно объяснить различиями при выборе границы линейной фазы роста. В нашем случае мы использовали комплексную модель накопительной кривой, приведенной в данной работе: по окончании линейной фазы следует фаза замедления роста, которую мы также описываем соответствующим уравнением, причем сохраняется условие непрерывности роста культуры. Поэтому мы четко определяем время окончания линейной и начала фазы замедления роста – для полной среды это шестые, для разбавлений – девятые сутки (рис. 4.2). Тем не менее, тенденция к уменьшению продуктивности при увеличении разбавления среды остаётся. Авторы это объясняют уменьшением содержания питательных элементов, а также изменением ионной силы растворов при их разбавлении. Что касается величины удельной скорости

дыхания культуры, рассчитанной на фазе замедления роста, то её величина фактически не изменяется. Как показано в работе [Qiang, Guterman, Richmond, 1996], величина удельной скорости дыхания не постоянна и зависит от физиологического состояния культуры. Этим можно объяснить, что полученные нами значения удельной скорости дыхания на линейной фазе и фазе замедления роста отличаются более чем в два раза (табл. 4.1 и 4.2).

Предположим, что весь субстрат, выделенный в среду из распавшейся за счет дыхания биомассы, повторно задействуется в биосинтезе. Тогда динамика концентрации азота в среде должна описываться линейным уравнением (4.10) (рис. 4.3).

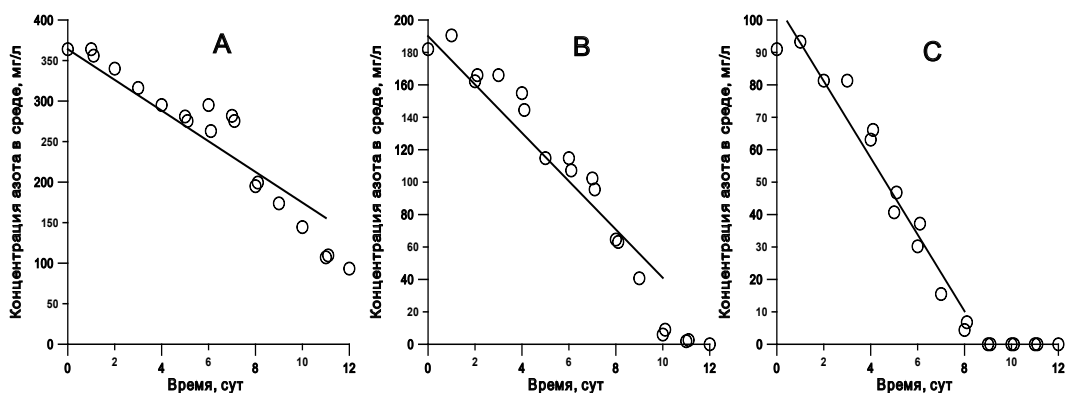


Рисунок 4.3. Динамика концентрации нитратного азота в среде. А – полная среда Заррук, В – разведение 1:1, С – разведение 1:3. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (4.10). Значения коэффициентов в табл. 5.1

Figure 2. The dynamics of nitrate in experiment. А – full Zarruk medium, В – dilution 1:1, С – dilution 1:3. Approximation of linear faze by equation (4.10). The value of coefficient in table 5.1

Однако, результаты расчетов истинной потребности Y_s^0 спирулины в азоте, представленные в табл. 4.1, показывают, что ассимиляция азота не соответствует линейному закону. При пересчёте количества ассимилированного азота на клеточное содержание белка [Барашков, 1972; Добрынина, Свешникова, 1958], мы получаем завышенное содержание белка в биомассе. Например, для полной среды $140,47 \text{ мг N/г АСВ} \cdot 6,25 = 878 \text{ мг белка/г АСВ} \approx 88 \%$, что не соответствует экспериментально определенным значениям (для полной среды – $53,39 \%$ [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001]). Таким образом, предположение о полном возврате субстрата из распавшейся биомассы неверно, поэтому при расчете величины потребности нельзя использовать линейное уравнение динамики субстрата в среде (4.10).

Рассмотрим другой случай: возврат субстрата из распавшейся биомассы не происходит, т. е. коэффициент возврата $\alpha = 0$. Аппроксимация динамики концентрации азота в среде уравнением (4.11) (рис. 4.4) позволяет рассчитать значения истинной потребности спирулины в азоте (табл. 5.2).

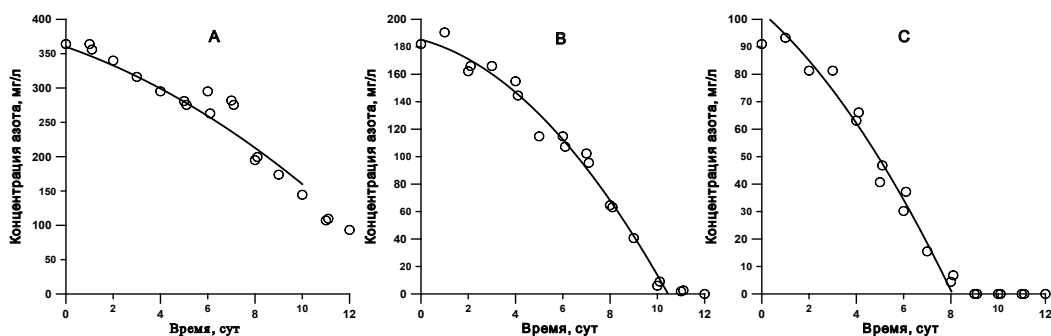


Рисунок 4.4. Динамика концентрации нитратного азота в среде. А – полная среда Заррук, В – разведение 1:1, С – разведение 1:3. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (4.11). Значения коэффициентов в табл. 4.2

Figure 4.4. The dynamics of nitrate in experiment. А – full Zarruk medium, В – dilution 1:1, С – dilution 1:3. Approximation of linear faze by equation (4.11). The value of coefficient in table 4.2

Таблица 4.2. Характеристики культуры *S. platensis* – возврат субстрата не происходит ($\alpha = 0$)
Table 4.2. Characteristics of the culture *S. platensis* – the nutrient don't return in medium ($\alpha = 0$)

Разведение среды	μ_r , сут ⁻¹	Y_s^0 , мг N/ г АСВ
Полная среда	0,1	81
1:1	0,2	68
1:3	0,2	67

Таблица 4.3. Соответствие экспериментальных [Дробецкая, Минюк, Тренкеншу и др., 2001] и расчетных значений содержания белка в биомассе *S. platensis*

Table 4.3. Experimental and calculated accordance of protein value in biomass of *S. platensis*

Разведение среды	Литературные данные, % АСВ	Расчетное значение, % АСВ
Полная среда	53	52
1:1	48	43
1:3	45	42

Пересчёт данных величин истинной потребности на клеточное содержание белка дает соответствие с экспериментально определенным значениям (табл. 5.3). Полученные результаты показывают, что при культивировании спирулины в условиях накопительной культуры динамика минерального азота в среде соответствует параболическому (4.11), а не линейному закону (4.10). Это означает, что азот, выделяющийся из распавшейся в результате темнового дыхания биомассы, не может быть повторно задействован в биосинтетических процессах, а переходит в какую-либо недоступную для водорослей форму. Этот факт объясняет "потери" азота – доля ассимилированного в составе биомассы азота составляет 42 – 47 % от общего количества потребленного из среды нитратного азота [Дробецкая, 2005] при культивировании спирулины в условиях накопительной культуры.

4.3. Расчёт величины потребности для непрерывной культуры

Основываясь на приведённом балансовом уравнении (4.5), для непрерывного процесса с удельной скоростью потока ω , выведем уравнение, описывающее динамику изменения концентрации субстрата в хемостате:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_S^0 \cdot \frac{dB_S}{dt} + \frac{dS_r}{dt} + \omega \cdot (S_0 - S).$$

Синтезируемую биомассу распишем через удельную скорость синтеза:

$$\frac{dB_S}{dt} = \mu_0 \cdot B.$$

Субстрат, выделяющийся при распаде биомассы пропорционален самой биомассе:

$$\frac{dS_r}{dt} = Y_S^0 \cdot \alpha \cdot \mu_r \cdot B.$$

Получим:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_S^0 \cdot \mu_0 \cdot B + Y_S^0 \cdot \alpha \cdot \mu_r \cdot B + \omega \cdot S_0 - \omega \cdot S.$$

Перенесем все слагаемые в левую часть:

$$\frac{dS}{dt} + \omega \cdot S + Y_S^0 \cdot \mu_0 \cdot B - Y_S^0 \cdot \alpha \cdot \mu_r \cdot B - \omega \cdot S_0 = 0.$$

Пусть культура находится в рамках линейной фазы роста, тогда запишем для биомассы:

$$B = B_0 + P_m \cdot t.$$

Уравнение, описывающее динамику биомассы, подставим в (3.49):

$$\frac{dS}{dt} + \omega \cdot S - Y_S^0 \cdot (B_0 + P_m \cdot t)(\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) - \omega \cdot S_0 = 0.$$

Решение данного дифференциального уравнения записывается в виде:

$$S(t) = S_0 + Y_S^0 (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \left(\frac{B_0}{\omega} - \frac{P_m}{\omega^2} \right) + Y_S^0 (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \cdot \frac{P_m}{\omega} \cdot t + \\ + Y_S^0 (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \left(\frac{P_m}{\omega^2} - \frac{B_0}{\omega} \right) \cdot e^{-\omega t}.$$

Для упрощения записи введем обобщённые коэффициенты:

$$Y_S^0 (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \left(\frac{B_0}{\omega} - \frac{P_m}{\omega^2} \right) = a, Y_S^0 (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \cdot \frac{P_m}{\omega} = b.$$

Тогда уравнение записывается в виде:

$$S(t) = S_0 + b \cdot t + a(1 - e^{-\omega t}). \quad (4.12)$$

Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (4.12) позволит рассчитать потребность в условиях хемостата (квазинепрерывного процесса), и наоборот, зная величину истинной потребности и кинетических характеристик роста, можно записать прогностическое уравнение динамики субстрата в непрерывной (квазинепрерывной) культуре.

Уравнение (4.12) применим при описании динамики нитратного азота и фосфора в полупроточной культуре *D. salina* (см. рис 3.5). Начальная концентрация азота в среде составляла 198 – 200 мг N/л. В течение экспоненциальной фазы происходило её незначительное уменьшение, а с началом линейной фазы роста концентрация азота интенсивно снижалась и на восьмые девятые сутки достигла нулевого значения. Рост культуры продолжался еще четыре дня, что свидетельствует об использовании внутриклеточных запасов азота [Fresnedo, Segra, 1992]. С началом квазинепрерывного режима происходило систематическое внесение биогенов в культуру, и, в зависимости от скорости протока, концентрация азота в среде увеличивалась и достигала стационарного уровня.

Начальная концентрация фосфора в суспензии составляла 40 – 42 мг P/л. В первые сутки она резко снижалась, далее наблюдалось линейное снижение и на 12 – 13 сутки достигла нулевого значения, в варианте А концентрация составила 4 мг P/л. На квазинепрерывном этапе концентрация фосфора увеличивалась и в вариантах С и D фактически достигла первоначального уровня.

Рассчитаем величины истинных потребностей культуры *D. salina* в азоте и фосфоре. Запишем уравнение динамики минерального субстрата в накопительной культуре (4.11) для случая $\alpha = 0$ (субстрат из распавшейся биомассы не возвращается):

$$S = S_0 - a \cdot (t - t_l) - b \cdot (t - t_l)^2,$$

где $a = Y_s^0 \cdot (P_m + \mu_r \cdot B_l)$, $b = \frac{1}{2} \cdot Y_s^0 \cdot \mu_r \cdot P_m$.

Аппроксимация представленных экспериментальных данных уравнением (4.11) (см. рис. 4,5 и 4,6) при $t_l = 3$ позволяет рассчитать величины удельной скорости дыхания и истинной потребности. Для этого решим алгебраическую систему, подставляя полученные при аппроксимации значения обобщённых коэффициентов a и b :

$$\begin{cases} a = Y_s^0 \cdot (P_m + \mu_r \cdot B_l), \\ b = \frac{1}{2} \cdot Y_s^0 \cdot \mu_r \cdot P_m. \end{cases}$$

Подставим из второго уравнения в первое удельную скорость дыхания μ_r , получим:

$$\begin{cases} a = Y_s^0 \cdot P_m + \mu_r \cdot B_l \cdot Y_s^0, \\ \mu_r = \frac{2b}{Y_s^0 \cdot P_m}. \end{cases}$$

$$a = Y_s^0 \cdot P_m + \frac{2b}{Y_s^0 \cdot P_m} \cdot B_l \cdot Y_s^0.$$

Таким образом, выражение для нахождения истинной потребности записывается в виде:

$$Y_s^0 = \frac{a \cdot P_m - 2b \cdot B_l}{P_m^2}.$$

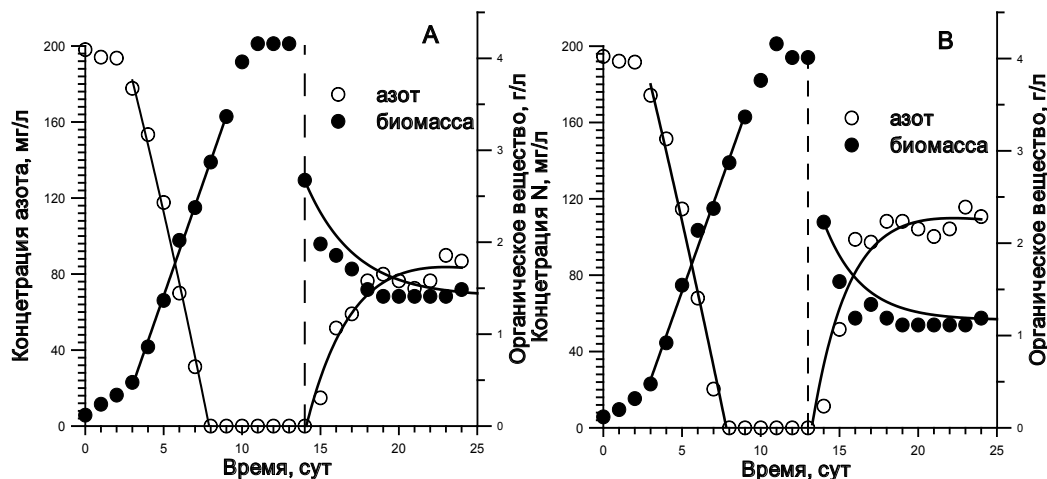


Рисунок 4.5. Динамика концентрации азота и биомассы для варианта С (А) и варианта D (В). Пунктирная линия – момент включения протока. Соответствие теоретических кривых (4.12) и экспериментальных данных на этапе квазинепрерывной культуры
Figure 4.5. Dynamics of nitrogen concentration and biomass for variant C (A) and variant D (B). Dotted line – the time of switching the duct. The conformance of theoretical curves by (4.12) and the experimental data for semicontinuous culture

Для варианта А получим:

$$Y_s^0 = \frac{29,25 \cdot 0,51 - 2 \cdot 1,12 \cdot 0,44}{0,51^2} = 54,09,$$

$$\mu_r = \frac{2 \cdot 1,12}{54,09 \cdot 0,51} = 0,08.$$

Для варианта В получим:

$$Y_s^0 = \frac{34,68 \cdot 0,51 - 2 \cdot 0,37 \cdot 0,41}{0,51^2} = 66,83,$$

$$\mu_r = \frac{2 \cdot 0,37}{66,83 \cdot 0,51} = 0,02.$$

Для варианта С получим:

$$Y_s^0 = \frac{33,077 \cdot 0,5 - 2 \cdot 0,829 \cdot 0,437}{0,5^2} = 63,25,$$

$$\mu_r = \frac{2 \cdot 0,829}{63,25 \cdot 0,5} = 0,05.$$

Для варианта D получим:

$$Y_s^0 = \frac{34,69 \cdot 0,47 - 2 \cdot 0,55 \cdot 0,52}{0,47^2} = 71,2,$$

$$\mu_r = \frac{2 \cdot 0,55}{63,25 \cdot 0,47} = 0,03.$$

Для варианта Е получим:

$$Y_s^0 = \frac{28,95 \cdot 0,44 - 2 \cdot 2,23 \cdot 0,7}{0,5^2} = 50,$$

$$\mu_r = \frac{2 \cdot 2,23}{63,25 \cdot 0,44} = 0,2.$$

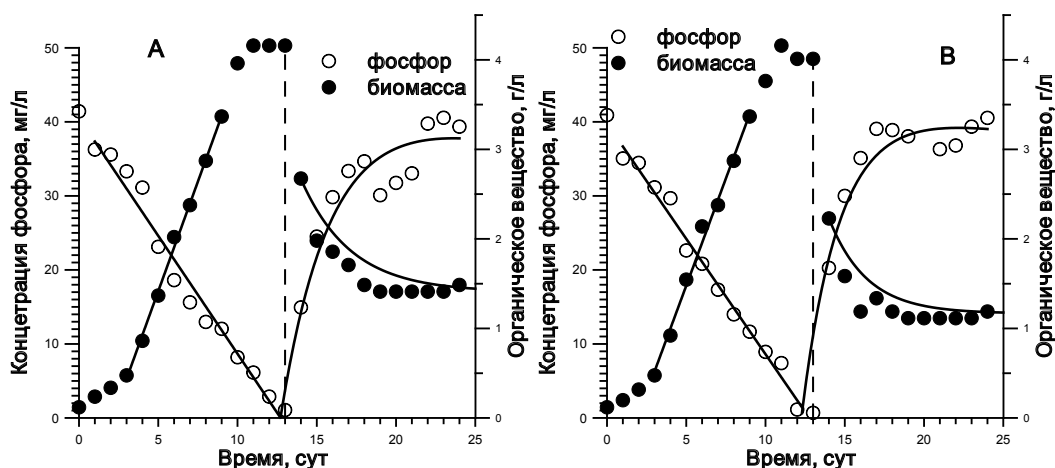


Рисунок 4.6. Динамика концентрации фосфора и биомассы для варианта С (А) и варианта D (В). Пунктирная линия – момент включения протока. Соответствие теоретических кривых и экспериментальных данных на этапе квазинепрерывной культуры

Figure 4.6. Dynamics of phosphorus concentration and biomass for variant C (A) and variant D (B). Dotted line – the time of switching the duct. The conformance of theoretical curves by (4.12) and the experimental data for semicontinuous culture

Таким образом, средняя величина истинной потребности по азоту для культуры *D. salina* составляет 60 мг N/г ОВ (82 мг N/г АСВ). Аналогичные расчёты произведем для определения истинной потребности по фосфору. Получим величину 6 мг Р/г ОВ (13,6 мг Р/г АСВ). Таким образом, величина отношения N:Р равняется 10.

Полученные значения истинной потребности по азоту и фосфору, а также кинетических ростовых характеристик (максимальной продуктивности, удельной скорости роста и дыхания), подставим в уравнение динамики субстрата в квазинепрерывной культуре (4.12). Полученная зависимость позволяет построить прогностическую зависимость, описывающую динамику нитратного азота и фосфатов. Соответствие теоретической кривой и экспериментальных данных представлено на рис. 4.5 и 4.6.

Глава 5

Моделирование скорости энергообмена в культурах микроводорослей

5.1. Скорость энергообмена

Исследования роста культур микроводорослей невозможны без анализ факторов, определяющих максимальные значения удельной скорости роста и продуктивности (скорости роста) микроводорослей в накопительной культуре при оптимальных значениях температуры, pH, скорости перемешивания и пр. Так, например, при экспоненциальном росте единственным внешним фактором питания, определяющим удельную скорость роста, является энергетическое (световое) обеспечение клеток. Наличие линейного участка указывает на то, что скорость роста определяется только скоростью газообмена (скоростью подачи углекислого газа в культуру). При этом продуктивность культуры максимальна и зависит от углеродного обеспечения клеток (см. раздел 2.1).

Увеличивая интенсивность освещения можно увеличить удельную скорость роста, но до определенного предела, а при увеличении подачи углекислого газа продуктивность также увеличится до предельных величин. При прочих оптимальных условиях в точке перехода от экспоненциальной к линейной фазе роста будут реализованы предельные скорости роста культуры. Эти скорости будут ограничены только внутренними свойствами клеток.

Рассмотрим некоторые известные данные о механизме трансформации энергии в микроводорослях, которые позволяют построить относительно простые количественные модели энергообмена и оценить его предельные скорости.

Обобщенная схема фотобиосинтеза. Основой метаболизма микроводорослей является фотосинтез. В процессе фотосинтеза выделяют две стадии: световую и темновую [Зитте, Вайлер, Кадерайт и др., 2008; Мокроносов, Гавриленко, Жигалова, 2006]. Световая стадия включает этапы от поглощения света пигментами до фосфорилирования, при котором низкоэнергетические формы аденозинфосфатов (АДФ) и никотинамидадениндинуклеотидфосфатов (НАДФ⁺) восстанавливаются до высокоэнергетических форм (АТФ и НАДФ·Н) [Зитте и др., 2008; Рубин, Кренделева, 2003]. Темновая стадия представляет собой цикл Кальвина, при котором за счет энергии окисления АТФ и НАДФ·Н до АДФ и НАДФ⁺ из минерального углерода синтезируется органический углерод [Мокроносов, Гавриленко, Жигалова, 2006, Рубин, Кренделева, 2003]. Синтез биомассы из биогенных элементов представляет собой разветвленную цепь ферментативных и транспортных реакций и происходит

также с участием энергии окисления АТФ и НАДФ·Н [Зитте, Вайлер, Кадерайт и др., 2008; Мокроносов, Гавриленко, Жигалова, 2006; Рубин, Кренделева, 2003].

Многие виды микроводорослей являются облигатными фототрофами (особенно ярко это выражено у некоторых видов синезеленых водорослей), для них характерно разделение процессов энергетического и конструктивного метаболизма, а единственным источником энергии для синтеза биомассы являются макроэрги АТФ и НАДФ·Н. Соответственно в клетках микроводорослей разделены и потоки энергетического и минерального питания. Учитывая эти свойства, можно построить обобщенную блок-схему (рис. 5.1) энерго- и массообмена микроводорослей.

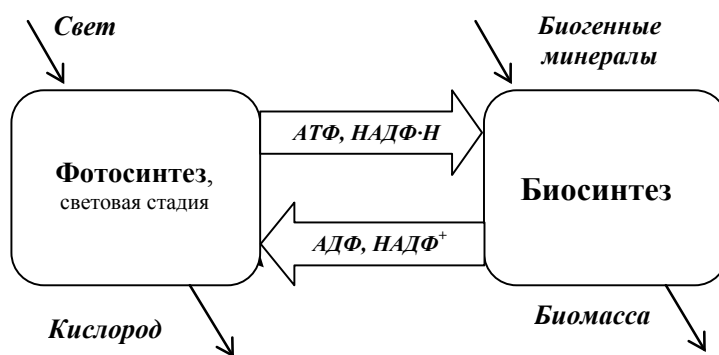


Рисунок 5.1. Схема сопряжения световых (фотосинтез) и темновых (биосинтез) реакций у микроводорослей. Пояснения в тексте

Figure 5.1. The scheme of agreement between light (photosynthesis) and dark (biosynthesis) reactions of microalgae. Explanations are given in the text

Разделение внешних потоков энергетического и минерального питания сразу приводит к вопросу о месте их сопряжения после преобразований в световых и синтетических реакциях внутри клетки. В схеме фотобиосинтеза таким местом являются реакции обмена, обеспечивающие согласование скоростей:



Вероятно, ключевым макроэргом, определяющим энергообмен, является НАДФ·Н. Это может быть подтверждено тем, что высокоэнергетическая форма образуется только в результате нециклического транспорта электрона. В отличие от АТФ, который может образовываться как при нециклическом, так и при циклическом фотофосфорилировании [Рубин, Кренделева, 2003].

Необходимо заметить, что предлагаемая схема является упрощенной, в ней не показано участие в реакциях обмена фосфора, электронов, протонов и других участников энергообмена. Кроме того, не показано участие в биосинтетических реакциях компонентов электрон – транспортной цепи,

например, ферредоксина, который может играть существенную (возможно, ключевую) роль не только в регуляции циклического и нециклического фотофосфорилирования, но и в образовании аминокислот, т. е. в реакциях превращения минеральных форм азота и серы в органическую форму [Рубин, Кренделева, 2003]. Учёт этих и других факторов приведет к громоздкости математических построений и сложностям в редуцировании систем уравнений и, как правило, к бессмысленности моделирования в целом [Тренкеншу, 2005]. Хотя в дальнейшем, возможно, игнорирование отдельных процессов приведет к неадекватному количественному описанию экспериментальных результатов; в этом случае схему придется дополнить.

Предельная скорость энергообмена. Базируясь на такой простейшей обобщенной модели, рост микроводорослей можно представить как процесс биосинтеза химических структур клетки из минеральных веществ за счет энергии высокопотенциальных форм макроэргов, т. е., рост микроводорослей можно рассматривать как совокупность энергообменных реакций. Соответственно, понятия скорости роста и скорости энергообмена являются эквивалентными, а предельные скорости энергообмена будут определять предельные скорости роста.

Обозначим количество молекул макроэргов (веществ, обеспечивающих энергообмен), находящихся в высокоэнергетическом и низкоэнергетическом состоянии, через E_+ и E_- , соответственно, а их сумму через E_0 :

$$E_+ + E_- = E_0.$$

Скорость синтеза биомассы (или роста микроводорослей) будет зависеть как от величины потока световой энергии, так и от величины потока минерального питания в клетку. Для динамически равновесного (стационарного) роста, скорости образования и расходования энергии в точке сопряжения будут пропорциональными количеству молекул макроэргов и равными:

$$\frac{dE_+}{dt} = \frac{dE_-}{dt}.$$

На первый взгляд, зависимость скорости энергообмена должна быть альтернативной: либо энергетическое, либо минеральное лимитирование. Однако такой вариант возможен только в случае, если суммарное количество макроэргов неограничено, в случае же ограниченного количества макроэргов скорость может быть ограничена внутренним содержанием макроэргов в клетке. При лимитировании микроводорослей светом скорость роста будет определяться скоростью образования высокоэнергетических форм:

$$\frac{dE_+}{dt} = \mu_i \cdot E_0,$$

но с повышением светового питания скорость роста будет увеличиваться только до величины, определяемой максимальной скоростью энергообмена:

$$\left(\frac{dE_+}{dt}\right)_{\max} = \mu_{\max}^i \cdot E_0.$$

Здесь: μ_i – удельная скорость энергообмена, определяемая интенсивностью действующего света и структурной организацией первичных фотохимических процессов фотосинтеза; μ_i^{\max} – максимальная удельная скорость энергообмена, не зависящая от света и определяемая только структурной организацией.

Аналогичная ситуация будет наблюдаться и для минерального лимитирования роста, при котором скорость расходования энергии (или образования низкоэнергетического состояния макроэргов) также будет ограничена:

$$\frac{dE_-}{dt} = \mu_s \cdot E_0,$$

$$\left(\frac{dE_-}{dt}\right)_{\max} = \mu_{\max}^s \cdot E_0.$$

Здесь: μ_s – удельная скорость энергообмена, определяемая потоком лимитирующего субстрата в клетку и структурной организацией системы биосинтеза; μ_s^{\max} – максимальная удельная скорость энергообмена, не зависящая от минерального питания и определяемая только структурной организацией системы биосинтеза.

В реальности трудно представить, что максимальные скорости ограничены количеством макроэргов в клетках. Такие ограничения возможны (хотя и маловероятны) только в переходных процессах.

Более вероятным представляется вариант, при котором максимальные скорости ограничены реакциями в более крупных и сложных структурах клетки. Такие структуры обеспечивают реакции энергообмена (окисления или восстановления) и включают транспортные и энзиматические системы, которые требуют некоторого времени (время оборота фермента или переносчика, τ_0) на каждый акт взаимодействия макроэрга с энергетическим или минеральным субстратом. Причем реакции окисления макроэргов (синтетические темновые реакции, включая цикл Кальвина) и восстановления (фотофосфорилирование) в общем случае могут происходить на разных ферментах и переносчиках, имеющих разную активность $\mu_{\max} = 1/\tau_0$. Точный общепринятый механизм сопряжения пока неизвестен. Несмотря на это, исходя из условия равенства скоростей, можно записать соотношения для предельных скоростей:

$$\left(\frac{dE_+}{dt}\right)_{\max} = \mu_{\max}^i F_{i0}, \quad \left(\frac{dE_-}{dt}\right)_{\max} = \mu_{\max}^s F_{s0},$$

$$\mu_{\max}^i F_{i0} = \mu_{\max}^s F_{s0}, \quad \frac{\mu_{\max}^s}{\mu_{\max}^i} = \frac{F_{i0}}{F_{s0}}.$$

Здесь максимальная скорость образования макроэргов выражена через активность (μ_{\max}^i) и количество переносчиков (или ферментов F_{i0}), ограничи-

вающих общую скорость реакции фотофосфорилирования при высоких интенсивностях света, а максимальная скорость расходования – через активность (μ_{max}^s) и количество ферментов F_{s0} , ограничивающих общую скорость биосинтеза при полном минеральном обеспечении.

Наиболее вероятен механизм сопряжения скоростей, регулируемых одним ключевым ферментом или комплексом, например, ферредоксин-НАДФ-редуктазой [Рубин, Кренделева, 2003]. В этом случае активности ($\mu_{max}^i = \mu_{max}^s = \mu^e$) и количества ($F_{i0} = F_{s0} = F_0$), будут одни и те же:

$$\left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max} = \left(\frac{dE_-}{dt} \right)_{max} = \mu^e F_0 \quad (5.1)$$

Обозначив полезную (свободную) энергию одной молекулы макроэрга через ς и заменив количество молекул на их суммарную энергию, получим выражение для максимальной скорости энергообмена:

$$\varsigma \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max} = \varsigma \mu^e F_0.$$

Максимальные скорости энергообмена могут реализоваться только при всех благоприятных физико-химических условиях среды (температура, pH, полное минеральное и световое обеспечение и т. д.). В этом случае максимальная скорость синтеза биомассы будет пропорциональна общему количеству ключевого фермента (или переносчика) и максимальной эффективности преобразования энергии макроэргов в химическую энергию, запасенную в биомассе. Если биомасса (B) содержит ключевой комплекс (F_0) в количестве f на единицу биомассы ($f = F_0/B$), а максимальная эффективность преобразования энергии макроэргов в химическую энергию биомассы – φ^0 , то для максимальной скорости синтеза биомассы можно записать:

$$P_{max}^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \mu^e F_0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma f \mu^e B. \quad (5.2)$$

Здесь: θ^0 – коэффициент перевода энергетических единиц в единицы биомассы, который обычно называют калорийностью биомассы.

Величина максимальной скорости синтеза биомассы не может являться независимым параметром для характеристики роста, т. к. зависит от количества фермента или биомассы. Разделив максимальную скорость синтеза на биомассу, получим максимальную удельную скорость роста:

$$\mu_{max} = \frac{P_{max}^0}{B} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma f \mu^e. \quad (5.3)$$

По сути, определяемая таким образом максимальная удельная скорость роста должна бы являться параметром, не зависящим от внешних потоков минерального и энергетического (светового) питания микроводорослей. Величина этого параметра определяется только механизмом трансформации энергии и вещества в клетке, включая структурную характеристику – содержание ключевого регулятора энергообмена в

биомассе клеток, однако экспериментально показано, что эта характеристика не является постоянной величиной [Рубин, Кренделева, 2003].

Из формулы видно, что максимальная удельная скорость роста зависит от содержания ключевого фермента или переносчика в клетке, участвующего в реакциях энергообмена. Количественно это содержание отражает величина f . Как указывалось выше, вещество, играющее ключевую роль, точно неизвестно, однако косвенные данные указывают на то, что его содержание в клетках является зависимым от внешних условий, по крайней мере, от облученности культуры микроводорослей. В кинетическом смысле данная характеристика количественно отражает понятие, называемое в биокинетике лимитирующим звеном [Чернавский, Иерусалимский, 1965] или узким местом метаболизма [Monod, 1949]. Более подробно это понятие обсуждается в работе [Тренкеншу, 2005].

5.2. Предельные скорости роста культур микроводорослей

При любом лимитирующем факторе (минеральном или энергетическом) скорость роста будет напрямую связана со скоростью энергообмена, причём результирующая скорость роста определяется минимальной величиной скорости энергообмена, которая, в свою очередь, зависит от наименьшего [Liebig, 1847] из потоков минерального и светового питания. При минеральном дефиците скорость энергообмена будет ограничена скоростью окисления макроэргов, при световом лимитировании – скоростью их восстановления. На основе полученных выражений для максимальных скоростей энергообмена (5.2) и (5.3) можно получить количественные закономерности роста микроводорослей при лимитировании питания клеток светом и минеральными элементами, а также величины потока питания, при котором происходит смена лимитирующих факторов.

Светозависимый рост. Рассмотрим обобщенный механизм преобразования световой энергии от поглощения фотосинтетическими пигментами до её трансформации в химическую энергию восстановленных форм макроэргов. Поглощение света определяется интенсивностью и спектром падающего на клетку света, а также оптическими свойствами клеток. Для культуры микроводорослей интенсивность поглощения фотонов (или энергии) можно выразить через интенсивность света, падающего на поверхность культуры (I_0), и коэффициент поглощения (α):

$$I_n = \alpha \cdot I_0.$$

Коэффициент поглощения является безразмерной величиной и зависит от спектральных свойств источника света и пигментного состава культуры.

Поглощенная пигментами энергия мигрирует по пигментной матрице к реакционным центрам фотосинтеза, в которых происходит их восстановление за счет последовательной передачи электрона от воды к ферредоксин-НАДФ-редуктазе, где образуется высокоэнергетическая форма

НАДФ·Н. Одновременно, в процессе транспорта электрона, восстанавливается АТФ. Кроме того, АТФ может восстанавливаться в процессе нециклического фотофосфорилирования [Рубин, Кренделева, 2003]. Таким образом, при полном минеральном обеспечении и прочих оптимальных значениях внешней среды скорость образования макроэргов будет определяться скоростью поглощения фотонов (I_n) и количеством квантов, необходимых для восстановления одной молекулы макроэрга (φ_e):

$$\frac{dE_+}{dt} = \varphi_e \cdot I_n.$$

В энергетических единицах выражение для скорости восстановления (полезной) энергии макроэргов можно выразить через интенсивность поглощения световой энергии (I_e) путем учета энергии отдельного фотона ($h\nu$):

$$I_e = (h\nu) \cdot I_n,$$

$$\varsigma \frac{dE_+}{dt} = \frac{\varphi_e}{(h\nu)} I_e.$$

Отсюда находим скорость роста культуры микроводорослей как функцию скорости поглощения световой энергии или поверхностной облученности культуры:

$$P^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \frac{dE_+}{dt} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \varphi_e I_n = \frac{\varphi_{max}}{\theta^0} \frac{I_e}{h\nu}, \quad (5.4)$$

$$\varphi_e \varphi^0 \varsigma = \varphi_{max}.$$

В данном выражении скорость роста отнесена к единице освещаемой поверхности культуры и носит название чистой продуктивности культуры. Полученное выражение показывает прямолинейную зависимость между интенсивностью поглощения света и чистой продуктивностью культуры.

Для удобства запишем уравнение в нормированном виде:

$$P_{norm}^0 = \frac{P^0}{P_{max}^0} = \frac{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \frac{dE_+}{dt}}{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max}} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e F_0} = \lambda_i. \quad (5.5)$$

Записанное в таком виде уравнение показывает, что скорость синтеза биомассы, выраженная в нормированном виде, прямолинейно зависит от λ_i (количества квантов света, поступающих на одну молекулу ключевого комплекса за время его оборота). Фактически эта величина представляет собой приведенную плотность потока субстрата, лимитирующего рост [Тренкеншу, 2005].

Однако скорость роста увеличивается с ростом освещенности до некоторого предела и ограничена максимальным значением (P_0^{max}), которое определяется внутренней структурой клеток микроводорослей (узким местом). Используя принцип Блекмана [Blackman, 1905] для смены лимитирующих факторов, можно записать простейшее уравнение зависимости скорости роста от интенсивности поглощения света в виде ломаной:

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_p; \lambda_i \leq 1 \\ 1; \lambda_i \geq 1 \end{cases} \quad (5.6)$$

Напомним, что уравнение (5.6) справедливо для случая всех прочих оптимальных условий внешней среды.

Лимитирование роста минеральными элементами питания. При внешнем лимитировании роста минеральным питанием, скорость энергообмена будет ограничена скоростью поступления низкоэнергетических форм макроэргов в область сопряжения реакций энергообмена. В этом случае расход энергии будет линейно связан с окислением АТФ и НАДФ·Н, зависящим от скорости поступления молекул лимитирующего вещества. Если поток элементов питания обозначить через I_s , а количество молекул макроэргов, необходимых для ассимиляции одной молекулы субстрата, через φ_s , то для скорости энергообмена можно записать:

$$\begin{aligned} \frac{dE_-}{dt} &= \varphi_s I_s, \\ \varsigma \frac{dE_-}{dt} &= \varsigma \varphi_s I_s. \end{aligned}$$

Отсюда находим скорость синтеза биомассы микроводорослей как функцию скорости потребления энергии макроэргов и связанную с ней скорость ассимиляции элементов питания:

$$P^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \frac{dE_-}{dt} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \varphi_s I_s = \frac{\varphi_s \varphi_{max}}{\varphi_e \theta^0} I_s.$$

При нормировке относительно максимальной скорости последнее выражение примет вид:

$$P_{norm}^0 = \frac{\varphi_s I_n}{\mu^e F_0} = \lambda_s. \quad (5.7)$$

Полученные выражения справедливы для скоростей, не превышающих максимальную скорость энергообмена. Данная формула также справедлива только для скоростей, не превышающих максимальную, т. е. нормированные значения не должны превышать единицу.

В итоге зависимость скорости роста от приведенной плотности потока элементов питания (λ_s), при всех других оптимальных условиях внешней среды, в простейшем виде также можно представить в виде ломанной:

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_s; \lambda_s \leq 1 \\ 1; \lambda_s \geq 1 \end{cases} \quad (5.8)$$

Смена лимитирующих факторов. Формально выражения, полученные для светового и минерального лимитирования роста микроводорослей, можно обобщить в виде уравнения:

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_s; \lambda_s \leq \lambda_i \\ \lambda_p; \lambda_s \geq \lambda_i \\ 1; \lambda_i \geq 1, \lambda_s \geq 1 \end{cases} \quad (5.9)$$

В реальности рост микроводорослей при неизменных световых условиях происходит исключительно в специальных системах культивирования (плотностат). Такие системы позволяют стабилизировать не только световое питание клеток, но и стабилизировать уровень их минерального питания, вплоть до их полного обеспечения энергией и элементами, и достигать максимальных значений скорости роста, ограниченных только внутренними видоспецифическими свойствами.

На рис. 5.2 графически представлены зависимости скорости «чистого» фотобиосинтеза микроводорослей от обеспеченности элементами питания при различном световом обеспечении клеток, рассчитанные по обобщенному уравнению. Здесь скорость нормирована относительно максимального значения, измеренного для насыщающих ($\lambda_i \geq 1$) интенсивностей света.

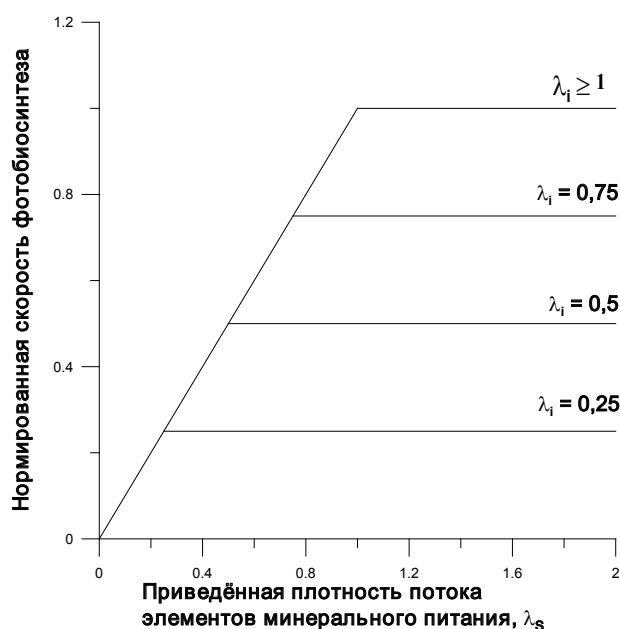


Рисунок 5.2. Зависимости скорости «чистого» фотобиосинтеза от приведенной плотности потока элементов минерального питания при различной приведенной плотности потока светового обеспечения (указаны цифрами на прямых)

Figure 5.2. Dependence of “net” photobiosynthesis rate on reduced flow density of mineral nutrition elements at different reduced flow density of the light quantum flux (shown by numbers on the curves)

На рисунке видно, что с увеличением потока элементов минерального питания в клетку (например, за счёт увеличения концентрации данного элемента в среде) скорость роста микроводорослей увеличивается только до некоторого значения, определяемого заданными световыми условиями. За счет увеличения потока минерального питания увеличить скорость роста выше этого значения можно только при одновременном повышении уровня освещения. Т. е. точки пересечения прямых на приведенном графиче-

ке соответствуют значению потоков светового и минерального питания и, соответственно, скорости роста, при которых происходит смена лимитирующего фактора. Максимальные значения скорости роста достигаются при значениях приведенных плотностей потоков светового и минерального питания, превышающих единицу.

Аналогичную картину можно получить и для семейства прямых, описывающих зависимости скорости от приведенной плотности потока фотонов при различном минеральном обеспечении клеток микроводорослей (рис. 5.3). Здесь скорости также нормированы относительно максимального значения, измеренного для насыщающих потоков светового и минерального питания. В этом случае повышение интенсивности освещения клеток приведёт к увеличению скорости роста только при одновременном повышении потока минерального питания в клетку. Точки пересечения прямых на приведенных графиках соответствуют точкам на кривой накопительной культуры микроводорослей, в которых происходит смена лимитирующих факторов. В случае накопительной культуры эти точки отражают окончание экспоненциальной фазы роста. Это позволяет экспериментально исследовать зависимость скорости роста от интенсивности действующего света, используя результаты, полученные в периодическом режиме выращивания клеток. Кроме того, наличие линейной фазы в таких культурах позволяет исследовать зависимость скорости роста от углеродного обеспечения клеток.

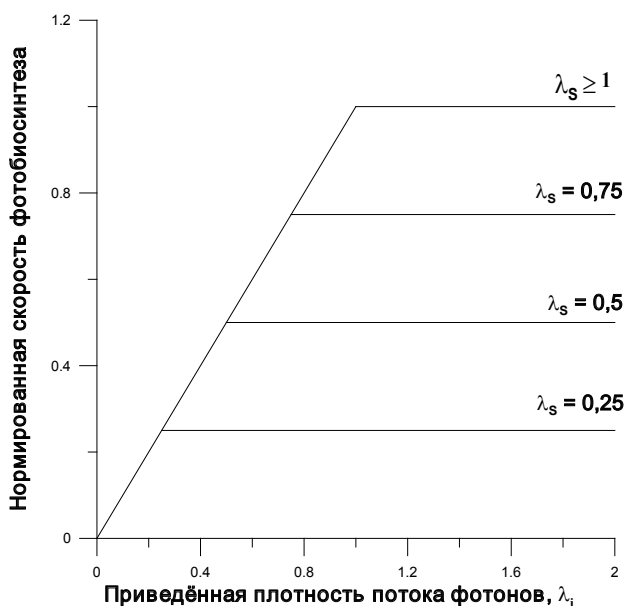


Рисунок 5.3. Зависимости скорости «чистого» фотобиосинтеза от приведенной плотности потока фотонов при различной приведённой плотности потока элементов минерального питания (указаны цифрами на прямых)

Figure 5.3. Dependence of “net” photobiosynthesis rate on reduced flow density of the light quantum flux at different reduced flow density of mineral nutrition elements (shown by numbers on the curves)

ГЛАВА 6

Моделирование индивидуального роста клеток микроводорослей

6.1. Индивидуальный рост клеток в плотностате

В этой главе рассмотрим применение обобщённой модели (5.9) для описания роста индивидуальной клетки микроводоросли в плотностатной культуре в зависимости от обеспеченности её энергетическим субстратом. Знание того, как происходит рост индивидуального организма в популяции важно, по крайней мере, в двух отношениях. В экологическом отношении это знание является необходимым шагом при построении моделей, описывающих динамику роста всей популяции. Кроме того, динамика субстрата в окружающей среде зависит от характера клеточного роста. В контексте внутривидовой конкуренции за субстрат характер роста может определять, будут ли клетки одного возраста обладать конкурентным преимуществом перед клетками другого [Williams, 1971].

Таким образом, наша задача сводится к нахождению закона роста индивидуальной клетки микроводоросли в популяции при различном обеспечении её энергетическим субстратом.

Скорость «чистого» фотобиосинтеза культуры микроводорослей, отнесённая к единице освещаемой поверхности и выраженная в нормированном виде, прямолинейно зависит от количества квантов света, поступающих на одну молекулу ключевого комплекса за время его оборота (5.9):

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_s; \lambda_s \leq \lambda_i \\ \lambda_p; \lambda_s \geq \lambda_i \\ 1; \lambda_i \geq 1, \lambda_s \geq 1 \end{cases}.$$

С использованием принципа Блэкмана [Blackman, 1905] для смены лимитирующих факторов было записано простейшее уравнение зависимости скорости роста микроводорослей от интенсивности поглощения света в виде ломаной, которое справедливо для случая всех прочих оптимальных условий внешней среды (5.6):

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_i, & 0 \leq \lambda_i \leq 1; \\ 1, & \lambda_i > 1. \end{cases}$$

Рост популяций микроводорослей, описываемый в случае светового лимитирования соотношениями (5.6) и (5.9), рассматривался как совокупность световых и биосинтетических реакций, или как процесс фотобиосинтеза. Соответственно, понятия скорости роста и скорости синтеза биомассы считались эквивалентными и относились к популяции. В контексте данной

работы эти понятия будут относиться к единичной клетке, а под скоростью роста клетки будет пониматься скорость увеличения её биомассы b или объёма v . Единственное отличие, на наш взгляд, будет состоять лишь в том, что в этом случае популяцию по отношению к индивидуальной клетке можно рассматривать как внешнюю среду, влияющую на её световое обеспечение.

Для количественного выражения роста микроводорослей наиболее часто используют величину удельной скорости роста [Перт, 1978; Печуркин, Терсков, 1975]. Если плотность ρ клеточного вещества остаётся постоянной в течение клеточного цикла, то выражение для удельной скорости роста μ можно записать в следующем виде:

$$\mu = \frac{db}{bdt} = \frac{d(\rho v)}{\rho v dt} = \frac{dv}{v dt}.$$

Удельная скорость роста зависит от множества факторов внешней среды, но не может превышать некоторого видоспецифического максимального значения μ_{\max} , поэтому для сравнительных оценок удобно пользоваться нормированной относительно этого значения величиной удельной скорости роста:

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\max}}.$$

В отличие от μ , нормированная удельная скорость роста является безразмерной величиной и может принимать значения от нуля до единицы.

В нормированном относительно своего максимального значения безразмерном виде можно записать и другую кинетическую характеристику роста, продуктивность $p = \mu b$, представляющую собой абсолютную скорость роста клетки:

$$p_{\text{norm}} = \frac{p}{p_{\max}} = \frac{1}{p_{\max}} \cdot \frac{db}{dt} = \frac{1}{(db/dt)_{\max}} \cdot \frac{db}{dt}.$$

Отметим, что нормированная удельная скорость роста и нормированная продуктивность равны между собой:

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{\mu b}{\mu_{\max} b} = \frac{p}{p_{\max}} = p_{\text{norm}} \quad (6.1).$$

Введём следующие обозначения: $p = P^0$, $p_{\max} = P_{\max}^0$, $p_{\text{norm}} = P_{\text{norm}}^0$. С учётом (6.1), в новых обозначениях выражение (5.9) запишется следующим образом:

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e F_0} = \lambda_i.$$

Из последнего уравнения следует, что удельная скорость роста будет постоянна только при постоянной приведённой плотности потока фотонов. Этим требованиям отвечает плотностатный метод культивирования, позволяющий стабилизировать как световое, так и минеральное обеспечение клеток в культуре. Как известно, плотностат является способом управления культурой, при котором плотность культуры (концентрация биомассы или числа клеток) поддерживается на заданном уровне (см. раздел 3.4). В

плотностате удельная скорость протока ω регулируется в зависимости от удельной скорости роста μ культуры таким образом, чтобы она всегда была равной удельной скорости роста культуры.

Контроль плотности культуры в строго непрерывном режиме выращивания предполагает использование методов, которые не влияют на рост клеток. Наиболее подходящим можно считать оптический метод оценки плотности культуры. Способ управления ростом культуры при стабилизации оптической плотности на заданном уровне назван турбидостатом. Впервые он был использован для исследования роста микробных популяций. Важно, что турбидостат даёт возможность получить устойчивый экспоненциальный рост культуры микроводорослей без лимитирования роста клеток элементами минерального питания, хотя при этом возможно лимитирование светом или потоком углекислого газа. Иными словами, турбидостат – это типичный хеомостатный процесс культивирования по обеспечению микроводорослей энергетическим субстратом [Белянин, Сидько, Тренкеншу, 1980].

Таким образом, в плотностате имеется принципиальная возможность исследовать в чистом виде влияние главного фактора, определяющего рост микроводорослей – световые условия, в которых растут клетки. Эти световые условия складываются из внешнего фактора – облучённости культуры, и внутреннего – оптических свойств самой культуры и составляющих её клеток. Кроме того, перемешивание суспензии также играет немаловажную, а порой, и решающую роль в обеспечении индивидуальных клеток в культуре энергетическим субстратом [Richmond, 2004].

В нелимитированных условиях при полном обеспечении минеральным и энергетическим питанием продуктивность клетки максимальна (см. (5.2)):

$$p_{\text{norm}} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e b.$$

Разделив последнее выражение на биомассу, получаем максимальную удельную скорость роста клетки:

$$\mu_{\text{max}} = \frac{p_{\text{max}}}{b} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e.$$

Из данного соотношения видно, что максимальная удельная скорость роста является постоянной величиной и определяется только внутренней структурой клетки: содержанием узких мест и их активностью. Эта структурная максимальная скорость роста является видоспецифической величиной и может реализоваться только при оптимальных факторах внешней среды. При этом нормированная скорость роста и удельная скорость роста клетки будут равны единице:

$$p_{\text{norm}} = \mu_{\text{norm}} = 1.$$

Постоянство максимальной удельной скорости роста означает экспоненциальное увеличение биомассы клетки со временем:

$$b = b_0 e^{\mu_{\text{max}} t}. \quad (6.2)$$

Тем не менее, имеются данные [Williams, 1971] о линейном росте индивидуальных клеток микроводорослей. Выясним, какие световые условия могут приводить к линейному росту индивидуальных клеток.

При оптимальных внешних условиях нормированная продуктивность клетки равна единице. В случае светового лимитирования эта величина меньше единицы и линейно зависит от приведённой плотности потока фотонов, поглощаемых клеткой:

$$p_{\text{norm}} = \frac{p}{p_{\text{max}}} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e F_0} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e f b} = \lambda_i.$$

Отметим, что в плотностатной культуре при лимитировании роста клетки только световым питанием нормированная продуктивность клетки будет линейно зависеть от приведённой плотности потока фотонов до тех пор, пока величина λ_i не станет равной единице (см. формулу (5.6)).

Поток поглощаемых клеткой фотонов (I_n) связан с приходящим на клетку потоком фотонов (I_0) соотношением:

$$I_n = \alpha \cdot I_0,$$

где α – коэффициент поглощения, зависящий от оптических свойств клетки и спектрального состава приходящего на клетку излучения. Коэффициент поглощения можно выразить через оптическую плотность клетки (D), абсолютное (π) или относительное (β) содержание хлорофилла в её биомассе и показатель поглощения хлорофилла (k):

$$I_n = \alpha \cdot I_0 = (1 - 10^{-D}) I_0 = (1 - 10^{-k\pi}) I_0 = (1 - 10^{-k\beta b}) I_0.$$

С точки зрения поглощения клеткой световой энергии возможны два предельных случая – случай малого поглощения и случай полного поглощения [Белянин, 1984].

1) *Малое поглощение.* В этом случае оптическая плотность клетки $D \approx 0$, а коэффициент поглощения $\alpha \approx k\beta b$. Тогда

$$I_n = \alpha \cdot I_0 = k\beta b I_0$$

и для нормированной скорости роста можно записать:

$$p_{\text{norm}} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e f b} = \frac{\varphi_e k\beta b I_0}{\mu^e f b} = \frac{\varphi_e k\beta I_0}{\mu^e f} = \lambda_i. \quad (6.3)$$

Если относительное содержание хлорофилла в клетке (β) не меняется, то её нормированная скорость роста будет линейно связана с потоком фотонов I_0 , приходящих на клетку. При фиксированной величине I_0 нормированная скорость роста p_{norm} будет постоянна. Линейная связь в последнем выражении сохраняется для значений λ_i , не превышающих единицу.

Рассмотрим, к какому закону роста клетки приводит соотношение (6.3). Поскольку

$$p_{\text{norm}} = \mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\text{max}}},$$

то

$$\begin{aligned}\mu &= p_{\text{норм}} \cdot \mu_{\text{макс}} = \\ &= \frac{\varphi_e k \beta I_0}{\mu^e f} \cdot \frac{\varphi^0}{\theta^0} \leq f \mu^e = \frac{\varphi^0 \varphi_e \leq k \beta}{\theta^0} \cdot I_0\end{aligned}$$

При постоянной величине I_0 удельная скорость роста μ будет постоянной, следовательно, имеем экспоненциальный закон роста (рис. 6.1):

$$b = b_0 e^{\mu t} \quad (6.4).$$

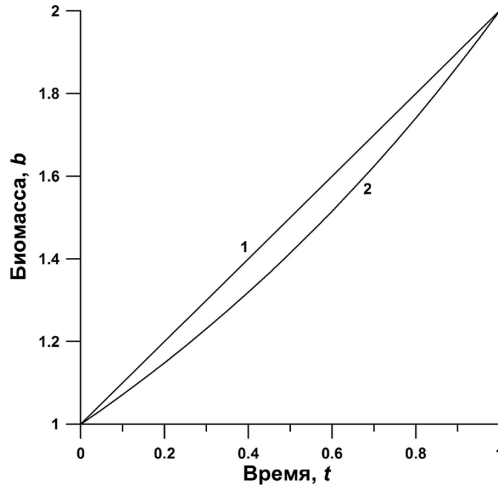


Рисунок 6.1. Закон роста клетки: 1 – линейный, 2 – экспоненциальный
Figure 6.1. The cell growth law: 1 – linear, 2 – exponential

По форме записи закон роста (6.4) аналогичен закону (6.2), однако в отличие от последнего, он получен для случая слабого поглощения лимитирующего потока фотонов. Удельная скорость роста в выражении (6.4) меньше максимальной и зависит от уровня энергетического обеспечения клетки. Под этой величиной можно понимать удельную скорость роста, реализуемую клеткой в культуре при заданных (неоптимальных) световых условиях.

2) *Полное поглощение.* В случае полного поглощения света клеткой её оптическая плотность $D \rightarrow \infty$, и коэффициент поглощения $\alpha \approx 1$. Тогда

$$I_n = \alpha \cdot I_0 = I_0.$$

Для нормированной скорости роста можно записать:

$$p_{\text{норм}} = \frac{\varphi_e I_0}{\mu^e f b}.$$

Удельная скорость роста клетки:

$$\mu = p_{\text{норм}} \cdot \mu_{\text{макс}} = \frac{\varphi_e I_0}{\mu^e f b} \cdot \frac{\varphi^0}{\theta^0} \leq f \mu^e = \frac{\varphi^0 \varphi_e \leq I_0}{\theta^0} \cdot \frac{1}{b}.$$

Умножая на биомассу, получаем абсолютную скорость роста клетки:

$$p = \mu b = \frac{\varphi^0 \varphi_e \leq I_0}{\theta^0}.$$

То есть при заданном уровне освещённости и полном поглощении света клеткой её продуктивность будет постоянной. Это означает линейный рост биомассы клетки со временем (рис. 6.1):

$$b = \mu t + b_0. \quad (6.5)$$

Таким образом, линейный рост клетки возможен при полном поглощении ею лимитирующего потока фотонов.

В последние десятилетия не прекращаются исследования, направленные на выяснение законов роста индивидуальных клеток микроводорослей в популяциях. Однако, поскольку большинство работ носит экспериментальный, а не теоретический характер, то их авторы, в основном, обсуждают точность экспериментальных методик прямого или косвенного определения законов роста клеток. В настоящей работе на основе схемы «чистого» фотобиосинтеза микроводорослей и понятия о приведённой плотности потока субстрата проведено теоретическое рассмотрение роста индивидуальной клетки микроводоросли в плотностатной культуре. Исследование показало, что при прочих оптимальных условиях скорость роста клетки определяется уровнем её светового обеспечения, а закон увеличения биомассы клетки со временем зависит от её светопоглощающих свойств. В предельных случаях, рассмотренных в настоящей работе, при световом лимитировании рост клетки либо экспоненциальный (при слабом поглощении света), либо линейный (при полном поглощении света). В промежуточных случаях, по всей видимости, закон роста клетки будет иным.

6.2. Индивидуальный рост клеток в хемостате

Как правило, экспериментальные и теоретические исследования кинетики роста индивидуальных клеток проводили для культур одноклеточных организмов, находящихся в фазе экспоненциального роста, когда рост клеток не ограничен внешними условиями [Bell, Anderson, 1967a; Bell, Anderson, 1967b; Collins, Richmond, 1962; Koch, Schaechter, 1962; Kubitschek, 1969; Tyson, Hannsgen, 1986]. Рассмотрим рост единичной клетки микроводоросли, находящейся в условиях хемостата. Ранее показано, при внешнем лимитировании роста микроводорослей минеральным питанием скорость «чистого» фотобиосинтеза культуры микроводорослей, отнесённая к единице освещаемой поверхности и выраженная в нормированном виде, прямолинейно зависит от количества молекул лимитирующего субстрата, поступающих на одну молекулу ключевого фермента или комплекса, ограничивающего рост при отсутствии лимитирования, за время его оборота (5,7):

$$P_{\text{norm}}^0 = \frac{P^0}{P_{\text{max}}^0} = \frac{\varphi_e I_s}{\mu^e F_0} = \lambda_s.$$

$$P_{\text{max}}^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varepsilon f \mu^e b.$$

$$\mu_{\max, b}^0 = \frac{P_{\max, b}^0}{b} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e.$$

Аналогично предыдущему разделу будем рассматривать рост единичной клетки микроводоросли. Для количественного выражения роста объёма v или биомассы b клетки используем величины удельной (μ) и нормированной удельной скорости роста (μ_{norm}):

$$\mu = \frac{db}{bdt} = \frac{dv}{vdt},$$

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\max}},$$

где μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста. Также запишем выражения для продуктивности (p) и нормированной продуктивности (p_{norm}) клетки:

$$p = \mu b,$$

$$p_{\text{norm}} = \frac{p}{p_{\max}} = \frac{1}{p_{\max}} \cdot \frac{db}{dt} = \frac{1}{(db/dt)_{\max}} \cdot \frac{db}{dt}.$$

p_{\max} – максимальная абсолютная скорость роста (продуктивность).

В нормированном виде относительная и абсолютная скорости роста связаны соотношением:

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{\mu b}{\mu_{\max} b} = \frac{p}{p_{\max}} = p_{\text{norm}}$$

Введём следующие обозначения: $p = P^0$, $p_{\max} = P_{\max}^0$, $p_{\text{norm}} = P_{\text{norm}}^0$, $\mu_{\max} = \mu_{\max, b}^0$. С учётом новых обозначения выражение (5.7) запишется следующим образом:

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{\varphi_e I_s}{\mu^e F_0} = \lambda_s.$$

В хемостате, при лимитировании клеточного роста одним из элементов питания, скорость роста клетки будет ниже максимальной [Monod, 1949; Monod, 1950] и будет определяться величиной потока этого элемента в клетку.

Поток лимитирующего элемента питания из водной среды в клетку пропорционален произведению концентрации этого элемента в околосклеточной среде (s) и площади поверхности клетки (σ):

$$I_s \sim s\sigma.$$

Введя коэффициент пропорциональности, связанный с проницаемостью клеточной поверхности для данного элемента питания, можно записать:

$$I_s = K_{\sigma} s\sigma.$$

Подставляя это выражение в уравнение для нормированной скорости роста (5.7), получаем:

$$p_{\text{norm}} = \frac{\varphi_e I_s}{\mu^e F_0} = \frac{\varphi_e K_{\sigma} s\sigma}{\mu^e F_0} = \frac{\varphi_e K_{\sigma} s\sigma}{\mu^e f b} = \lambda_s.$$

По условию хемостата $s = \text{const}$. Поэтому, если относительное содержание ключевых ферментов или переносчиков в клетке постоянно, то скорость роста клетки будет определяться её геометрией – соотношением σ/b .

$$p_{\text{norm}} = \frac{\varphi_e K_\sigma s}{\mu^e f} \frac{\sigma}{b} = \frac{\varphi_e K_\sigma s}{\mu^e f \rho} \frac{\sigma}{v} = \frac{\varphi_e K_\sigma s}{\mu^e f \rho} \sigma_{sp}. \quad (6.6)$$

Отношение поверхности к объёму σ_{sp} носит название удельной поверхности.

При строго изометрическом росте объём клетки возрастает пропорционально кубу радиуса или иного линейного показателя l , а площадь клеточной поверхности – пропорционально квадрату l [Константинов, 1986]. Следовательно, удельная поверхность клетки будет изменяться обратно пропорционально её линейному размеру:

$$\sigma_{sp} \sim \frac{1}{l}.$$

То есть в условиях хемостата при увеличении линейного размера клетки, её нормированная скорость роста p_{norm} будет уменьшаться.

Предположим, что клетка обладает шарообразной формой. С геометрической точки зрения этот случай является предельным, поскольку шар обладает минимальной величиной удельной поверхности по сравнению с другими фигурами. Для шарообразной клетки радиуса r удельная поверхность выражается соотношением:

$$\sigma_{sp} = \frac{\sigma}{v} = \frac{4\pi r^2}{(4/3)\pi r^3} = \frac{3}{r}.$$

Подставив последнее выражение в уравнение (6.6), получаем

$$p_{\text{norm}} = \frac{\varphi_e K_\sigma s}{\mu^e f \rho} \sigma_{sp} = \frac{\varphi_e K_\sigma s}{\mu^e f \rho} \frac{3}{r}.$$

Используя связь между нормированными скоростями роста, запишем в явном виде зависимость удельной скорости роста клетки от её радиуса:

$$\mu = p_{\text{norm}} \cdot \mu_{\text{max}} = \frac{\varphi_e K_\sigma s}{\mu^e f \rho} \frac{3}{r} \cdot \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e = \frac{3\varphi^0 \varphi_e \zeta K_\sigma s}{\theta^0 \rho} \frac{1}{r}. \quad (6.7)$$

Найдём закон роста клетки. Согласно (6.7), удельная скорость роста шарообразной клетки обратно пропорциональна её радиусу. Перейдя к объёму, получаем

$$\mu = \frac{3\varphi^0 \varphi_e \zeta K_\sigma s}{\theta^0 \rho} \cdot \left(\frac{3}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}} v^{-\frac{1}{3}} = C \cdot v^{-\frac{1}{3}}, \text{ где } C = \frac{3\varphi^0 \varphi_e \zeta K_\sigma s}{\theta^0 \rho} \cdot \left(\frac{3}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}}.$$

Для удельной скорости роста клетки можно записать:

$$\frac{dv}{vdt} = C v^{-\frac{1}{3}}. \quad (6.8)$$

Разделяя переменные и интегрируя с учётом начального условия $v(0) = v_0$, получаем решение уравнения (6.8):

$$v = \left(Ct + \sqrt[3]{v_0}\right)^3.$$

Поскольку для фитопланктона плотность $\rho \approx 1$ [Константинов, 1986], то

$$b = \left(Ct + \sqrt[3]{b_0} \right)^3$$

Таким образом, биомасса клетки микроводоросли растёт со временем по кубическому закону.

На рисунке 6.2 пунктиром показана зависимость биомассы клетки от времени. Начальное значение биомассы принято равным единице. Для сравнения на том же рисунке сплошными линиями показаны графики линейной и экспоненциальной зависимости для случаев светового лимитирования клеточного роста. Из графиков видно, что кубический закон роста занимает промежуточное положение между линейным и экспоненциальным законами.

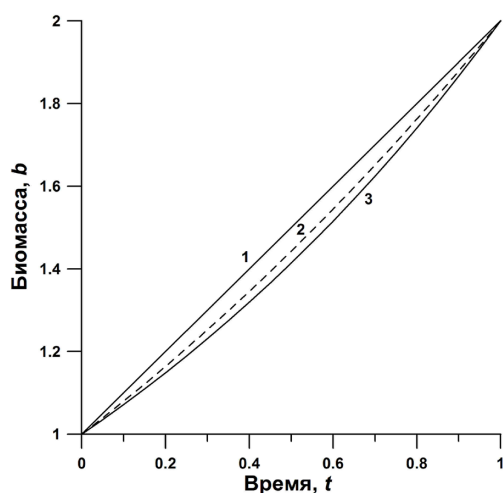


Рисунок 6.2. Рост клетки в течение клеточного цикла: 1 – линейный, 2 – кубический, 3 – экспоненциальный

Figure 6.2. Cell growth during the cell cycle: 1 – linear, 2 – cubic, 3 – exponential

ГЛАВА 7

Модель динамики пигментов в экспоненциальной фазе роста культуры микроводорослей

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных о динамике роста различных видов микроводорослей в накопительной (периодической) культуре. В большинстве случаев эти материалы включают наряду с измерением плотности культуры (число клеток, биомасса, оптическая плотность) параллельные измерения содержания какого-либо пигмента в клетках микроводорослей (хлорофилла а, фикобилипотеинов и т. д.) [Гудвиллов, Лелеков, 2008; Паламодова, 2009; Минюк, Дробецкая, Тренкеншу и др., 2002]. Анализ такого рода данных представляет собой сложную задачу, т. к. относительное содержание пигментов в клетке или биомассе является не только не постоянной величиной и может изменяться в десятки раз, но и характеризуется сильной нелинейностью в процессе роста культуры. На рисунке 7.1 показаны примеры изменения содержания хлорофилла а и фикоцианина в биомассе микроводорослей в процессе роста спирулины [Минюк, Дробецкая, Тренкеншу и др., 2002]. Приведённые экспериментальные результаты показывают, что переходные процессы в динамике относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей могут характеризоваться «ложным стартом» при полном минеральном обеспечении роста, который наблюдается при смене световых условий в культуре.

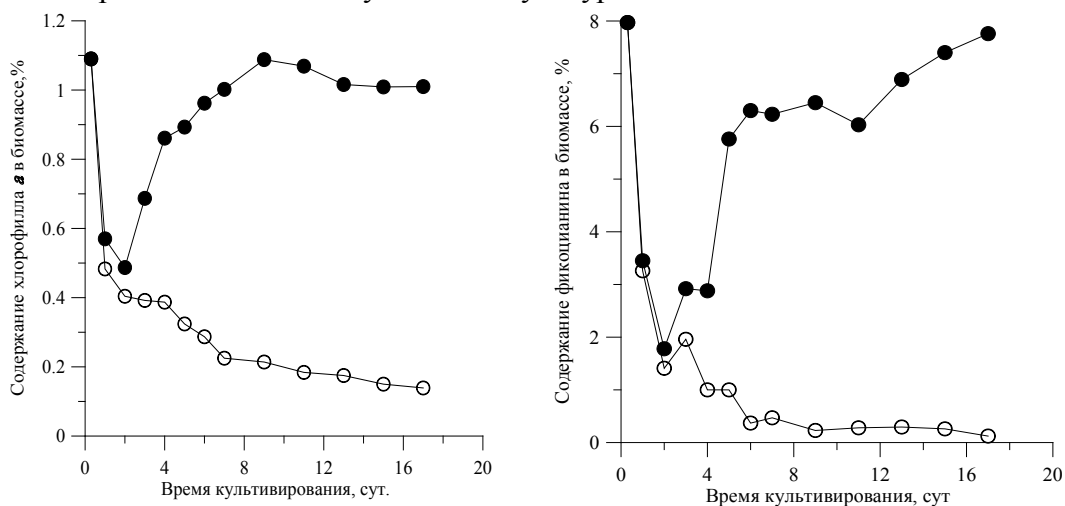


Рисунок 7.1. Динамика содержания пигментов в микроводорослях при полном минеральном обеспечении (●) и лимитировании клеток азотом (○)

Figure 7.1. The dynamics of pigment content in microalgae with full mineral (●) and the limitation of the cells by nitrogen (○)

К настоящему времени практически отсутствуют внятные объяснения этому феномену, хотя и существуют модельные представления о зависимости относительного содержания пигментов в клетках микроводорослей от факторов внешней среды (особенно световых условий) для стационарного роста в непрерывной культуре. И даже при использовании таких моделей возникают сложности в описании динамики переходных процессов, связанных с акклимацией клеток при изменении какого-либо фактора внешней среды. Особенно ярко акклимация (в виде изменения содержания пигментов в клетках) может проявляться на начальных стадиях роста накопительной культуры микроводорослей. Чаще всего это происходит при значительном изменении световых условий выращивания, в частности, при резком изменении поверхностной освещенности или уменьшении плотности культуры за счет разбавления. Это явление получило название фотоакклимации клеток микроводорослей к изменению внешней освещенности [Биологический ..., 1986; Рабинович, 1951; Хол, Рао, 1983].

Большинство существующих моделей светозависимого содержания пигментов в биомассе микроводорослей построены для условий стационарного динамического равновесия, которое обеспечивается либо хеомостатным, либо плотностатным методом культивирования. Непрерывный режим обеспечивает стабильность характеристик роста и среды, которые не изменяются с течением времени.

В современной литературе большое внимание уделяется кинетическим моделям, описывающим влияние освещенности на величину относительного содержания пигментов в биомассе β [Белянин, Ковров, 1968; Геворгиз, Тренкеншу, 1998; Тренкеншу, 1984; Cloern, Grenz, Vidergar-Lucas, 1995; Finenko, Hoepffner, Williams et al., 2003; Flynn, 2003; Geider, MacInture, Kana, 1997]. Постоянство условий культивирования обеспечивает возможность варьирования только одного фактора среды (например, освещенности), что позволяет существенно упростить математический аппарат модели, переходя от системы дифференциальных к системе алгебраических уравнений связи.

Обычно указанные модели представляются в виде гиперболической зависимости β от освещенности: при малых освещенностях величина β имеет максимальное значение β_m ; с увеличением интенсивности света β уменьшается и в пределе достигает некоторого минимального значения β_{min} . Отметим, что каждая точка такой кривой является квазистационарным состоянием, которое определяется уровнем внешней освещенности и плотности культуры. Однако это состояние достигается в течение некоторого времени, при этом динамика переходного процесса во времени носит сложный нелинейный характер.

В основе предложенных нами ранее простейших моделей роста микроводорослей лежат основные кинетические коэффициенты роста культуры микроводорослей: удельная скорость роста, максимальная продуктивность, удельная скорость дыхания и истинная потребность (см.

главы 1, 2). Используя данные характеристики, нами получены модели, позволяющие описывать как динамику биомассы, так и изменение содержания некоторых биохимических компонентов клеток (хлорофилл а, белок, фикоэритрин) при квазинепрерывном культивировании микроводорослей [Лелеков, 2009]. Однако предложенные модели не могут объяснить многочисленные экспериментальные данные уменьшения относительного содержания пигментов в биомассе при увеличении плотности накопительной культуры. Здесь следует отметить, что это явление наблюдается при невысоких плотностях культуры, когда клетки обеспечены минеральным питанием, а при высоких плотностях возможно минеральное лимитирование синтеза пигментов. Это хорошо иллюстрируется приведенными данными на рисунке 7.1.

Нами сделана попытка создать динамическую модель относительного содержания пигментов в биомассе клеток при изменении световых условий. Модель основывается на положении о полном или частичном разрушении пигментов за счет фотодеструкции. В модели рассматривается экспоненциальный рост микроводорослей, который может реализоваться в начальной стадии накопительной культуры или в плотностатном режиме культивирования при невысоких плотностях клеток.

7.1. Моделирование процессов синтеза, фотодеструкции и восстановления пигментов при экспоненциальном росте культуры микроводорослей

Пусть культура микроводорослей переведена в плотностатный режим непрерывного культивирования при стабилизации плотности на низком уровне, что обеспечивает экспоненциальный рост популяции клеток. Аналогичные условия создаются и в экспоненциальной фазе роста накопительной культуры, т. е. рост культуры ничем не лимитирован и клетки растут с максимальной удельной скоростью роста, которая определяется только внешними световыми условиями. В культурах низкой плотности клетки микроводорослей не затеняют друг друга, поэтому скорость роста определяется только внешним освещением. Т. е. μ_m является константой при неизменной интенсивности падающего света. В этом случае динамика плотности культуры описывается экспоненциальной зависимостью (2.1):

$$B = B_0 e^{\mu_m t},$$

Обозначим величину относительного содержания пигмента в биомассе через β :

$$\beta = \frac{\pi}{B},$$

где $\pi = \pi(t)$ – функция, описывающая динамику концентрации пигмента, $B = B(t)$ – функция, описывающая динамику плотности культуры (концентрацию биомассы).

Таким образом, задача сводится к определению вида функциональной зависимости, описывающей изменение концентрации пигмента во времени.

Модель 1. Скорость синтеза пигментов. Фотодеструкции пигментов не происходит.

Изменение концентрации пигмента в произвольный момент времени t определяется скоростью синтеза пигмента ($d\pi_s/dt$), которая пропорциональна скорости роста культуры водорослей в целом [Геворгиз, Тренкеншу, 1998]. При этом коэффициентом пропорциональности является величина, определяемая как максимальное содержание пигмента в биомассе β_m :

$$\frac{d\pi_s}{dt} = \beta_m \cdot \frac{dB}{dt} = \beta_m \cdot \mu_m \cdot B.$$

Разделив переменные, проинтегрируем последнее уравнение и, учитывая, что при начальных условиях $t = 0$, $\pi_s = \pi_{s0}$, в результате получим:

$$\begin{aligned} \frac{d\pi_s}{dt} &= \beta_m \cdot \mu_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \\ \int d\pi_s &= \beta_m \cdot \mu_m \cdot B_0 \cdot \int e^{\mu_m \cdot t}, \\ \pi_s &= \beta_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} = \pi_{s0} \cdot e^{\mu_m \cdot t}. \end{aligned} \quad (7.1)$$

Уравнение (7.1) показывает, что концентрация синтезированного пигмента экспоненциально увеличивается, причём показатель скорости синтеза равен максимальной удельной скорости роста биомассы в целом.

В этом случае относительное содержание пигмента в биомассе будет:

$$\beta = \frac{\pi_s}{B} = \frac{\pi_{s0} e^{\mu_m \cdot t}}{B_0 e^{\mu_m \cdot t}} = \frac{\pi_{s0}}{B_0} = \beta_m.$$

Таким образом, если бы не было явления фотодеструктивного окисления пигментов, то относительное содержание пигмента в клетках с течением времени не изменялось бы и, всегда было равным β_m . Такая модель противоречит всем известным экспериментальным данным (см. рис. 7.1), но позволяет оценить количество синтезированного пигмента в любой момент времени.

Модель 2. Фотодеструкция пигментов. Рассмотрим случай деструктивного распада пигментов под действием света. Изменение концентрации пигмента в произвольный момент времени t теперь определяется скоростями синтеза ($d\pi_s/dt$) и фотодеструкции ($d\pi_d/dt$). Тогда содержание пигмента в культуре (π) будет определяться разностью скоростей синтеза и фотодеструкции:

$$\frac{d\pi}{dt} = \frac{d\pi_s}{dt} - \frac{d\pi_d}{dt}.$$

Для произвольного момента времени t будет справедливо балансовое равенство:

$$\pi = \pi_s - \pi_d,$$

$$\frac{\pi}{B} = \frac{\pi_s}{B} - \frac{\pi_d}{B},$$

$$\beta = \beta_s - \beta_d.$$

Это равенство будет справедливым и для начального состояния культуры:

$$\pi_0 = \pi_{s0} - \pi_{d0},$$

$$\frac{\pi_0}{B} = \frac{\pi_{s0}}{B} - \frac{\pi_{d0}}{B},$$

$$\beta_0 = \beta_{s0} - \beta_{d0} = \beta_m - \beta_{d0}.$$

Здесь β_0 – содержание пигмента в биомассе в начальный период культивирования, которое определяется предысторией культуры.

Оценим скорость фотодеструкции. Данная величина будет зависеть от интенсивности действующего света [Тренкеншу, 1984]:

$$\frac{d\pi_d}{dt} = k_1 \cdot \alpha \cdot I_0,$$

где k_1 – коэффициент, показывающий долю квантов в общем световом потоке, которые вызывают фотодеструкцию; α – коэффициент поглощения культуры микроводорослей, определяемый по закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$\alpha = 1 - 10^{-k_2 \cdot \pi},$$

где k_2 – удельный коэффициент поглощения, зависящий от спектральных свойств источника света и суспензии микроводорослей.

Из последней формулы видно, что коэффициент поглощения зависит от концентрации пигмента в культуре. При высокой плотности культуры свет поглощается практически полностью, а коэффициент поглощения равен единице. В культурах низкой плотности коэффициент поглощения прямопропорционален концентрации пигментов:

$$\alpha \cong k_2 \cdot \pi.$$

Т. е. в культурах низкой плотности скорость распада пигмента за счёт фотодеструкции можно записать в следующем виде:

$$\frac{d\pi_d}{dt} = k_1 \cdot k_2 \cdot I_0 \cdot \pi = K \cdot I_0 \cdot \pi = \mu_i \cdot \pi,$$

$$K = k_1 \cdot k_2,$$

$$\mu_i = K \cdot I_0.$$

С учетом последнего выражения уравнение баланса скоростей можно представить в виде:

$$\begin{aligned}\frac{d\pi}{dt} &= \frac{d\pi_s}{dt} - \frac{d\pi_d}{dt}, \\ \frac{d\pi_s}{dt} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \\ \frac{d\pi_d}{dt} &= \mu_i \cdot \pi, \\ \frac{d\pi}{dt} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_i \cdot \pi.\end{aligned}$$

Запишем последнее уравнение в виде:

$$\frac{d\pi}{dt} + \mu_i \cdot \pi = \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

В итоге имеем линейное дифференциальное уравнение первого порядка со специальной правой частью, решив которое получим динамику накопления пигмента в культуре. Вначале решим уравнение без правой части:

$$\frac{d\pi}{dt} + \mu_i \cdot \pi = 0.$$

Общее решение такого уравнения:

$$\begin{aligned}\pi &= u \cdot e^{-\int \mu_i \cdot dt}, \\ \int \mu_i \cdot dt &= \mu_i \cdot t, \\ \pi &= u \cdot e^{-\mu_i \cdot t},\end{aligned}$$

где u – неизвестная функция.

Производная от общего решения:

$$\begin{aligned}\pi &= u \cdot e^{-\mu_i \cdot t}, \\ \frac{d\pi}{dt} &= \frac{du}{dt} \cdot e^{-\mu_i \cdot t} - \mu_i \cdot u \cdot e^{-\mu_i \cdot t}.\end{aligned}$$

Полученные выражения подставим в основное дифференциальное уравнение:

$$\begin{aligned}\frac{du}{dt} \cdot e^{-\mu_i \cdot t} - \mu_i \cdot u \cdot e^{-\mu_i \cdot t} + \mu_i \cdot u \cdot e^{-\mu_i \cdot t} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \\ \frac{du}{dt} \cdot e^{-\mu_i \cdot t} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \\ \frac{du}{dt} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{(\mu_m + \mu_i) \cdot t}.\end{aligned}$$

Из последнего уравнения находим интегральное выражение для неизвестной функции:

$$\begin{aligned}u &= \int \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{(\mu_m + \mu_i) \cdot t} dt, \\ u &= \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \cdot e^{(\mu_m + \mu_i) \cdot t} + C.\end{aligned}$$

Подставим неизвестную функцию в общее решение:

$$\pi = \left(\frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \cdot e^{(\mu_m + \mu_i)t} + C \right) \cdot e^{-\mu_i t},$$

$$\pi = \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \cdot e^{\mu_m t} + C \cdot e^{-\mu_i t}.$$

Константу интегрирования C найдем из начальных условий:

$$t = 0, \pi = \pi_0,$$

$$\pi_0 = \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} + C,$$

$$C = \pi_0 - \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)}.$$

Окончательно имеем уравнение для описания динамики накопления пигментов в культуре:

$$\pi = \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \cdot e^{\mu_m t} + \left(\pi_0 - \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \right) \cdot e^{-\mu_i t}. \quad (7.2)$$

Разделив полученное выражение (7.2) на текущее значение плотности культуры B , получим уравнение, которое позволяет описать динамику изменения относительного содержания пигмента в биомассе:

$$\beta = \frac{\pi}{B} = \frac{\beta_m \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} + \left(\beta_0 - \frac{\beta_m \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \right) \cdot e^{-(\mu_m + \mu_i)t}. \quad (7.3)$$

При длительном культивировании микроводорослей в непрерывном плотностатном режиме с экспоненциальным ростом содержание пигментов в клетках стабилизируется на некотором уровне (β_{st}):

$$t \rightarrow \infty, \beta = \beta_{st},$$

$$\beta_{st} = \beta_m \cdot \frac{\mu_m}{\mu_m + K \cdot I_0}. \quad (7.4)$$

Из уравнения (7.4) видно, что с увеличением интенсивности действующего света стационарные значения относительного содержания пигментов неуклонно понижаются, что соответствует экспериментальным данным, и имеющиеся модельные представления объясняют это понижение [Geider, MacIntyre, Kana, 1996; Flynn, 2003]. Но при высоких интенсивностях света стационарные значения β стремятся к нулю. Это не соответствует корректно проведенным экспериментальным данным, имеющимся в литературе.

С учётом (7.4) уравнение для динамики β (7.3) можно привести к параметрическому виду:

$$\beta = \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-(\mu_m + K \cdot I_0)t}. \quad (7.5)$$

Коэффициент перед экспонентой в уравнении (7.5) может быть как положительным, так и отрицательным, в зависимости от разности начального содержания пигментов β_0 и стационарного значения β_{st} , что позволяет количественно описывать динамику как увеличения, так и уменьшения содержания пигментов в клетках. Однако изменение величины β по уравнению (7.5) имеет плавный монотонный (без экстремумов) характер перехода от начальных условий к стационарным. Уравнение не может описать «ложный старт», т. е. реальную картину динамики снижения относительного содержания пигментов в начальный период времени с дальнейшим его увеличением.

Модель 3. Фотодеструкция с последующим восстановлением пигментов.

Полагаем, что фотодеструкция проявляется в частичном разрушении пигментов и некоторая их доля может восстановиться до нормального состояния. Примем, что под действием света пигмент переходит в промежуточное (фотоокисленное) состояние (π_d). Из этого состояния пигмент переходит либо в нормальное состояние (восстанавливается, π_r), либо необратимо разрушается (π_π).

Общий баланс пигментов запишется в следующем виде:

$$\pi_s = \pi + \pi_d + \pi_r + \pi_\pi.$$

Для такого механизма обратимой фотодеструкции важно определиться с оценкой доли пигментов, которые измеряются в процессе экспериментальных исследований. Считая, что в момент измерения мы резко снижаем условия освещения, можно принять, что нет условий для необратимого разрушения пигмента. В этом случае, измеряемая концентрация пигмента в клетках будет определяться разностью концентраций синтезированного и необратимо разрушенного пигмента:

$$\pi + \pi_d + \pi_r = \pi_m = \pi_s - \pi_\pi,$$

$$\beta = \frac{\pi_m}{B} = \beta_m - \beta_\pi.$$

Первый случай.

Примем, что доля разрушенных форм пигмента (π_π) при переходе из фотоокисленного состояния – величина постоянная (δ):

$$\frac{\pi_\pi}{\pi_d} = \delta,$$

$$\pi_\pi = \delta\pi_d.$$

Следовательно, доля восстановленных форм пигмента (π_r) также будет постоянной:

$$\frac{\pi_r}{\pi_d} = 1 - \delta,$$

$$\pi_r = (1 - \delta)\pi_d.$$

В этом случае скорости разрушения и восстановления пигмента будут пропорциональны скорости фотодеструктивного окисления:

$$\frac{d\pi_{\pi}}{dt} = \delta \cdot \frac{d\pi_d}{dt},$$

$$\frac{d\pi_r}{dt} = (1 - \delta) \cdot \frac{d\pi_d}{dt}.$$

С учетом последних выражений уравнения для скорости изменения наблюдаемых концентраций пигмента в культуре:

$$\frac{d\pi_m}{dt} = \frac{d\pi_s}{dt} - \delta \cdot \mu_i \cdot \pi_m.$$

Фактически это означает, что решение будет аналогичным предыдущему (модель 2), и приведет к уравнению с постоянным коэффициентом δ перед величиной интенсивности света, который не повлияет на характер динамических кривых β .

Второй случай.

Наиболее вероятным представляется вариант механизма восстановления, который требует некоторого времени на процесс восстановления. Если μ_r – интенсивность процесса, то скорость восстановления можно записать в виде:

$$\frac{d\pi_r}{dt} = \mu_r \cdot \pi_d.$$

Аналогично для необратимого распада:

$$\frac{d\pi_{\pi}}{dt} = \mu_{\pi} \cdot \pi_d.$$

Для произвольного момента времени t можно записать балансовое уравнение для наблюдаемого (текущего) значения содержания пигмента в культуре в виде, представленном ранее:

$$\pi + \pi_d + \pi_r = \pi_m = \pi_s - \pi_{\pi},$$

$$\beta = \frac{\pi_m}{B} = \beta_m - \beta_{\pi}.$$

Скорость изменения текущего содержания пигментов в культуре будет зависеть от скоростей синтеза, фотодеструкции и восстановления:

$$\frac{d\pi_m}{dt} = \frac{d\pi_s}{dt} + \frac{d\pi_d}{dt} + \frac{d\pi_r}{dt} = \frac{d\pi_s}{dt} - \frac{d\pi_{\pi}}{dt}.$$

Подставим известные зависимости скоростей в последнее уравнение:

$$\frac{d\pi_s}{dt} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t},$$

$$\frac{d\pi_{\pi}}{dt} = \mu_{\pi} \cdot \pi_d,$$

$$\frac{d\pi_m}{dt} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_{\pi} \cdot \pi_d.$$

Вместе с выражением для скорости фотодеструкции получим систему дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами:

$$\begin{cases} \frac{d\pi_m}{dt} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_\pi \cdot \pi_d \\ \frac{d\pi_d}{dt} = \mu_i \cdot \pi_m \end{cases}$$

Продифференцируем первое уравнение системы по времени:

$$\frac{d^2\pi_m}{dt^2} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m^2 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_\pi \cdot \frac{d\pi_d}{dt}.$$

Подставим второе уравнение из системы в последнее выражение и запишем в виде дифференциального уравнения второго порядка с правой частью:

$$\begin{aligned} \frac{d^2\pi_m}{dt^2} &= \mu_m^2 \cdot \beta_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_\pi \cdot \mu_i \cdot \pi_m, \\ \frac{d^2\pi_m}{dt^2} + \mu_\pi \cdot \mu_i \cdot \pi_m &= \mu_m^2 \cdot \beta_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}. \end{aligned}$$

Так как коэффициенты в левой части уравнения постоянны, оно всегда приводится к квадратурам, и его частное решение имеет вид:

$$r^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i = 0.$$

Характеристическое уравнение имеет мнимые корни:

$$r_{1,2} = \pm \sqrt{-\mu_\pi \cdot \mu_i} = \pm \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot i.$$

В этом случае частное решение уравнения без правой части можно записать в виде:

$$\pi_{m0}^* = \pm C_1 \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t).$$

Или:

$$\pi_{m0}^* = C_3 \cdot \sin\left(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t\right) + C_4 \cdot \cos\left(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t\right),$$

$$C_3 = C_1 \cdot \cos C_2, C_4 = C_1 \cdot \sin C_2, \frac{C_4}{C_3} = \operatorname{tg} C_2.$$

Частное решение уравнения для правой части:

$$\pi_{m1}^* = C \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Теперь искомое решение дифференциального уравнения запишется в виде:

$$\pi_m = \pi_{m0}^* + \pi_{m1}^* = \pm C_1 \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + C \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Или:

$$\pi_m = C_3 \cdot \sin\left(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t\right) + C_4 \cdot \cos\left(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t\right) + C \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Разделив на текущее значение плотности культуры, получим относительное содержание пигментов в биомассе:

$$\beta = \frac{\pi_m}{B} = \frac{C_1}{B} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C}{B} \cdot e^{\mu_m \cdot t},$$

$$\beta = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C}{B_0} \cdot \beta_m.$$

Или:

$$\beta = \frac{C_3}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C_4}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \cos(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C}{B_0} \cdot \beta_m.$$

Рассматривая стационарные значения относительного содержания пигментов в биомассе (β_{st}), которые будут наблюдаться при $t \rightarrow \infty$, можно определить константу C :

$$t \rightarrow \infty, \beta = \beta_{st}$$

$$\beta_{st} = \frac{C}{B_0} \cdot \beta_m,$$

$$C = \frac{\beta_{st} \cdot B_0}{\beta_m}.$$

Зная наблюдаемое содержание пигмента в начальный момент времени ($t = 0$), можно определить C_4 и связь между постоянными C_1 и C_2 :

$$t = 0, \beta = \beta_0,$$

$$\beta_0 = \frac{C_1}{B_0} \cdot \sin C_2 + \beta_{st},$$

$$\frac{C_1}{B_0} \cdot \sin C_2 = \frac{C_4}{B_0} = \beta_0 - \beta_{st}.$$

Полученная разность может быть как положительной, так и отрицательной, в зависимости от начальных условий (предыстории культуры) и уровня освещения, при котором измеряется стационарное содержание пигментов. Теперь для относительного содержания пигмента можно записать:

$$\beta = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \beta_{st}, \quad (7.6)$$

$$\beta = \frac{C_3}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \beta_{st}.$$

В итоге получено 2 формы уравнения, позволяющие по экспериментальным данным найти обобщенные коэффициенты и описать динамику относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей в экспоненциальной фазе роста периодической (накопительной культуры). Однако полученные уравнения не позволяют в явном виде найти связь полученных обобщенных констант уравнения с кинетическими коэффициентами рассматриваемой модели и определить наличие «ложного старта» в динамических кривых роста.

Анализ модели. Для оценки наличия экстремумов в полученных урав-

нениях найдем производную по времени и приравняем её нулю. В момент времени (t_{ext}) величина относительного содержания пигмента будет экстремальной (β_{ext}). Эти величины могут быть экспериментально определены при исследовании динамики содержания пигментов в экспоненциальной фазе роста накопительной культуры микроводорослей.

$$\beta = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \beta_{st},$$

$$\frac{d\beta}{dt} = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \left(-\mu_m \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot \left(\cos(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) \right) \right).$$

Приравнивание производной нулю имеет более одного решения:

$$1. e^{-\mu_m \cdot t} = 0,$$

$$t \rightarrow \infty,$$

$$\beta = \beta_{ext} = \beta_{st}.$$

Это уже известный случай стационарного состояния. Второе решение позволяет найти постоянную C_2 :

$$2. -\mu_m \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot \left(\cos(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) \right) = 0,$$

$$\mu_m \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) = \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot \left(\cos(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) \right),$$

$$\operatorname{tg}(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) = \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m}, C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext} = \operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m},$$

$$C_2 = \operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} - \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}.$$

Подставляя значение этого коэффициента в уравнение для β при $t = t_{ext}$ можно найти коэффициент (C_1):

$$\beta_{ext} = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t_{ext}} \cdot \sin\left(\operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m}\right) + \beta_{st}.$$

После преобразования:

$$\operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} = \operatorname{arcsin} \frac{\frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m}}{\sqrt{1 + \frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2}}} = \operatorname{arcsin} \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}},$$

$$\beta_{ext} = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t_{ext}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}} + \beta_{st},$$

находим:

$$\frac{C_1}{B_0} = \frac{\beta_{ext} - \beta_{st}}{e^{-\mu_m \cdot t_{ext}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}}} = \frac{(\beta_{ext} - \beta_{st})}{e^{-\mu_m \cdot t_{ext}}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_\pi \cdot \mu_i}}.$$

Подставляем найденные константы интегрирования в решение динамического уравнения:

$$\beta = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \beta_{st},$$

$$C_2 = \operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} - \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext},$$

$$\frac{C_1}{B_0} = \frac{(\beta_{ext} - \beta_{st})}{e^{-\mu_m \cdot t_{ext}}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_\pi \cdot \mu_i}},$$

$$\beta = (\beta_{ext} - \beta_{st}) \cdot \sqrt{\frac{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_\pi \cdot \mu_i}} \cdot e^{-\mu_m \cdot (t - t_{ext})} \cdot \sin(\operatorname{arcsin} \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}} + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot (t - t_{ext})) + \beta_{st}.$$

Обозначим:

$$\sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}} = a,$$

Тогда:

$$\beta = \frac{(\beta_{ext} - \beta_{st})}{a} \cdot e^{-\mu_m \cdot (t - t_{ext})} \cdot \sin(\operatorname{arcsin} a + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot (t - t_{ext})) + \beta_{st}.$$

Константу C_3 определим из условия:

$$\frac{C_4}{C_3} = \operatorname{tg} C_2,$$

$$\frac{C_3}{B_0} = (\beta_0 - \beta_{st}) \frac{1 + \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} \operatorname{tg} \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}}{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} - \operatorname{tg} \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}} = c \cdot (\beta_0 - \beta_{st}).$$

Теперь вторую форму уравнения (7.6) можно записать в виде:

$$\begin{aligned} \beta &= (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \left(c \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t \right) + \beta_{st}, \\ \beta &= \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \left(c \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t \right). \end{aligned} \quad (7.7)$$

В двух формах уравнений присутствует параметр, отражающий стационарное значение относительного содержания пигментов микроводорослей при непрерывном выращивании микроводорослей. Величина этого параметра является светозависимой и может быть определена в отдельных экспериментах. Кроме того, этот параметр может быть выражен через кинетические коэффициенты используемого в данной работе механизма фотодеструкции при стационарном решении модели.

7.2. Описание экспериментальных данных

В качестве примера рассмотрим экспериментальные данные работы [Паламодова, 2009]. Автором проводились параллельные измерения числа клеток, биомассы и содержания хлорофилла а при переносе клеток *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia sp.* с низкой на высокую освещённость и наоборот (см. рис. 7.2, 7.3).

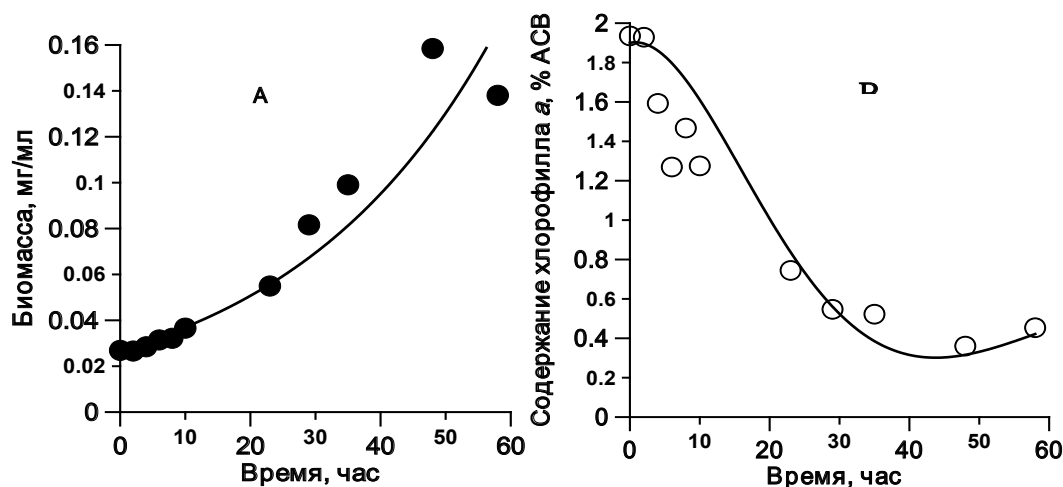


Рисунок 7.2. Динамика биомассы (А) и относительного содержания хлорофилла а (В) при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую освещённость [Паламодова, 2009]. Аппроксимация динамики биомассы уравнением (2.2), относительного содержания хлорофилла а уравнением (7.7)

Figure 7.2. Dynamics of the biomass (A) and relative content of chlorophyll a (B) *Ph. tricornutum* cells transferring from low to high illuminance [Паламодова, 2009]. Approximation of the biomass dynamics by equation (2.2), the relative content of chlorophyll a – equation (7.7)

Анализ полученного экспериментального материала позволил автору сделать заключение, что данные виды диатомей адаптировались к высокой интенсивности света путем уменьшения синтеза хлорофилла и повышения скорости роста клеток. При этом адаптация к низкой интенсивности света сопровождалась интенсивным синтезом хлорофилла а, который превышал скорость деления клеток. Подобное заключение является сильно упрощённым и не соответствуют современным представлениям о процессах фотодинамического действия света на живые клетки [Krasnovsky, 1998; Соловченко, 2009]. Однако в связи с наличием большого количества различных механизмов фотоакклимации клеток микроводорослей авторам достаточно тяжело проводить критический анализ своих результатов. Тем более ни одна из существующих моделей кинетики светозависимого содержания пигментов в клетках микроводорослей напрямую не может объяснить данных изменения величины β при накопительном режиме культивирования, потому что все они построены для условий стационарного динамического равновесия, обеспечиваемого либо с помощью плотно-

стата, либо с помощью хемостата. Поэтому использование динамической модели, предлагаемой в данной работе, позволит получить представления о процессах, протекающих в клетках накопительных культур микроводорослей при различных уровнях освещённости.

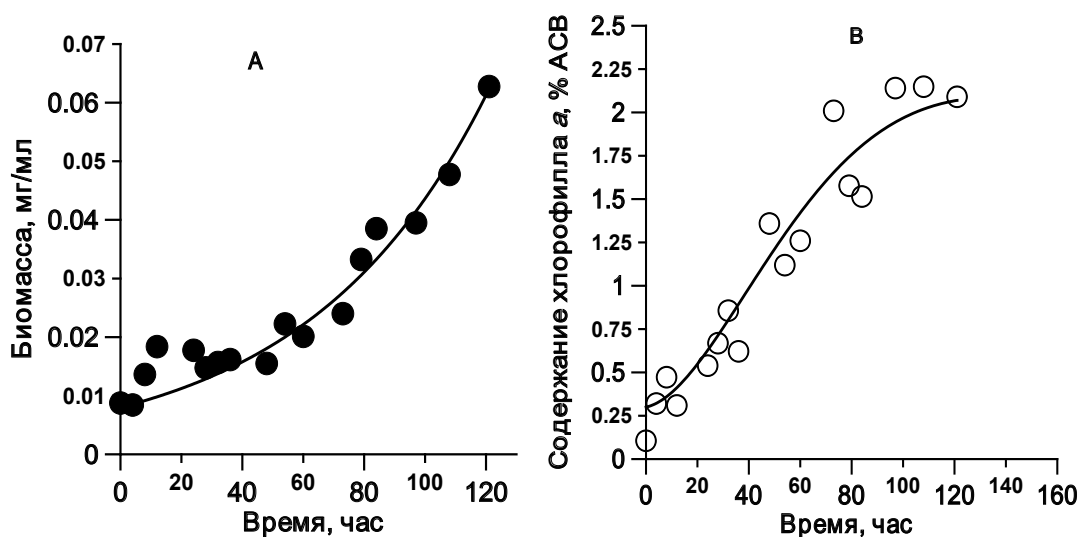


Рисунок 7.3. Динамика биомассы (А) и относительного содержания хлорофилла а (В) при переносе клеток *Ph. tricornutum* с высокой на низкую освещённость [Паламодова, 2009]. Аппроксимация динамики биомассы уравнением (2.2), относительного содержания хлорофилла а уравнением (7.7)

Figure 7.2. Dynamics of the biomass (А) and relative content of chlorophyll a (В) *Ph. tricornutum* cells transferring from high to low illuminance [Паламодова, 2009]. Approximation of the biomass dynamics by equation (2.2), the relative content of chlorophyll a – equation (7.7)

Прежде чем проводить описания данных динамики относительного содержания хлорофилла а проанализируем уравнение (7.7):

$$\beta = \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \left(c \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t \right)$$

В данное уравнение входит шесть параметров, которые определяют форму кривой. β_{st} – стационарное значение относительного содержания пигмента, которое является неизвестным коэффициентом модели, и может быть определено при аппроксимации реальных экспериментальных данных. Отметим, что данная величина есть функция от внешней освещённости, и может быть вычислена в соответствии со стационарным решением модели 3. Также отметим, что данный коэффициент является важнейшим критерием при оценке качества биомассы при организации промышленного производства микроводорослей [Боровков, 2008]. β_0 – начальное содержание пигмента в клетках культуры микроводорослей. Это экспериментально измеряемая величина. При дальнейшей работе с уравнением (7.7) необходимо заменить β_0 её численным значением, при этом уменьшится количество неизвестных

коэффициентов модели, повысится точность описания экспериментальных данных и её прогностические свойства. μ_m – максимальная удельная скорость роста культуры микроводорослей. Данный параметр является важнейшей характеристикой экспоненциального роста культур микроводорослей. Он может быть определён при аппроксимации уравнением (2.2) экспоненциальной фазы роста или традиционным способом логарифмирования разницы конечной и начальной концентрации клеток в единицу времени. $\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}$ – корень из произведения кинетических характеристик: μ_π – константа деградации или константа перехода возбуждённой формы пигмента в окисленное состояние, μ_i – константа возбуждения или константа перехода пигмента из основного в возбуждённое состояние. Отметим, что μ_i будет зависеть от величины внешней освещённости. Параметр c : данная величина может быть рассчитана, её значение также определяется значениями μ_π , μ_i , μ_m , а также t_{ext} – временем, соответствующим экстремуму функции (7.7).

На рис. 7.2 представлена аппроксимация экспериментальных данных по биомассе и относительному содержанию хлорофилла *a* при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую облучённость. Анализируя характер кривой, следует отметить, что на начальном этапе фотодеструктивное окисление пигмента преобладает над его синтезом, поэтому величина β уменьшается. Рассчитанные на данном этапе коэффициенты модели позволили построить прогностическую кривую содержания хлорофилла *a* (см. рис. 7.4 А). С течением времени плотность культуры микроводорослей увеличивается, поэтому всё меньше квантов света вызывает деструкцию и всё большее количество пигмента синтезируется. В связи с этим кривая имеет точку перегиба. Далее происходит увеличение содержания пигментов в клетке. Это связано с тем, что плотность культуры увеличивается, а средняя пространственная облучённость на одну клетку уменьшается. Таким образом, для поддержания постоянной удельной скорости роста необходимо больше пигментов в клетке. В итоге, мы достигаем стационарного равновесия, которое определяется величиной внешнего светового потока. Подобные рассуждения можно привести при переносе клеток *Ph. tricornutum* с высокой на низкую освещённость. В данном случае в начальный момент времени содержание пигмента растёт (рис. 7.3), достигая стационарного значения, определяемого внешней освещённостью (рис. 7.4 В).

Таким образом, предлагаемая модель описывает явление «ложного старта» при переносе клеток микроводорослей с низкой освещённости на высокую. В этом случае функция имеет явно выраженный минимум, который характеризуется параметрами β_{ext} и t_{ext} . Данные величины могут быть рассчитаны и являются кинетическими характеристиками роста культуры микроводорослей в данных условиях при заданной освещённости.

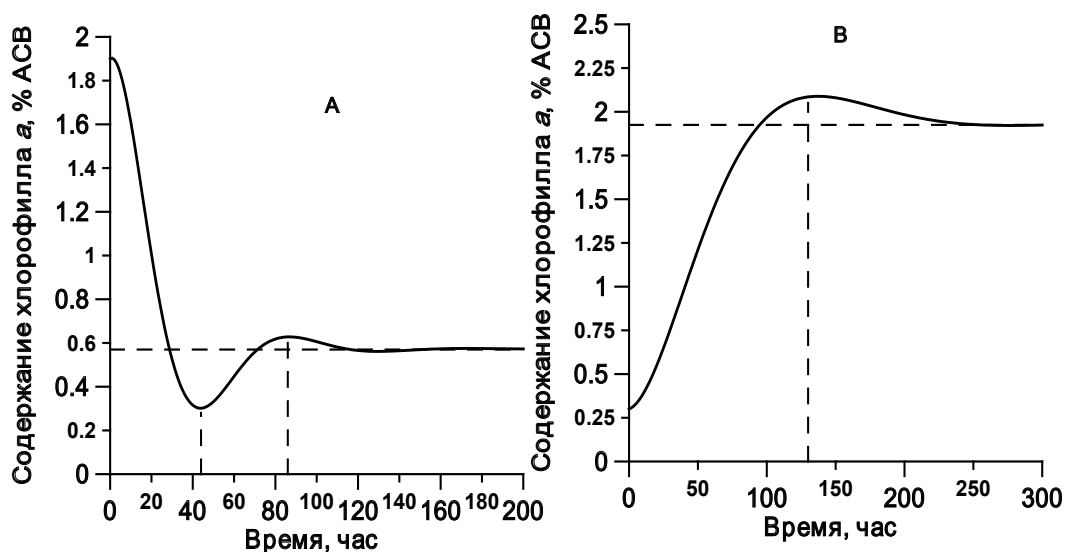


Рисунок 7.4. Теоретические кривые динамики относительного содержания хлорофилла а при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую (А) и с высокой на низкую (В) освещённость. Пунктиром отмечены экстремумы функции (7.7)

Figure 7.4. Theoretical curves of the relative content of chlorophyll a *Ph. tricornutum* cells transferring from low to high (A) and from high to low (B) illumination. Dashed line marks the extremum of the function (7.7)

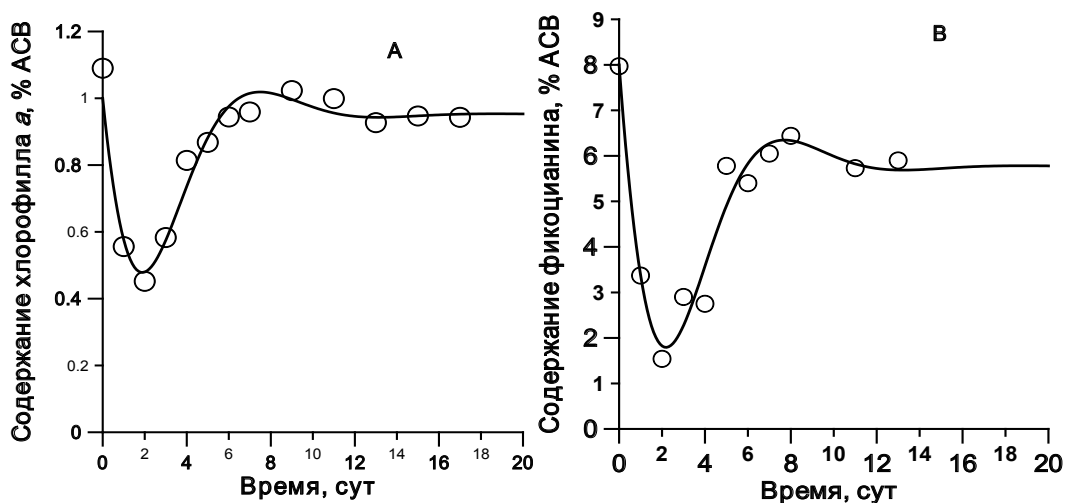


Рисунок 7.5. Динамика относительного содержания хлорофилла а (А) и С-фикоцианина (В) при культивировании *S. platensis* [Минюк, Дробецкая, Тренкеншу и др., 2002]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (7.7)

Figure 7.5. The dynamics of the relative content chlorophyll a (A) and C-phycoerythrin (C) during cultivation of *S. platensis* [Минюк, Дробецкая, Тренкеншу и др., 2002]. The approximation of experimental data by equation (7.7)

Полученные теоретически экстремумы функции динамики относительного содержания хлорофилла а для феодактилиума (рис. 7.4 А, В) находят экспериментальное подтверждение и при культивировании других видов микроводорослей. Например, в работе [Минюк, Дробецкая, Тренкеншу и др., 2002] представлена динамика относительного содержания хлорофилла а (рис. 7.5 А) и С-фикоцианина (рис. 7.5 В) при культивировании *Spirulina platensis*. В данной работе авторы приводят данные по росту биомассы и динамике пигментного состава при различных концентрациях нитратного азота в питательной среде. На рис. 7.5 представлена динамика β при полной обеспеченности азотом (200 мг N / л). Здесь мы наблюдаем высокое соответствие предложенной динамической модели с экспериментальными данными содержания и хлорофилла и С-фикоцианина. При лимитировании роста спироулины азотом (см. рис. 7.1) данная модель не применима, поскольку в этом случае не выполняется условие экспоненциального роста культуры микроводорослей. Нами также проведена верификация предложенной модели при описании данных относительного содержания В-фикоэритрина в клетках накопительной культуры *Porphyridium purpureum* (см. рис. 7.6). Как и в предыдущих случаях, модельная кривая, построенная по уравнению (7.7), характеризуется минимумом на первые сутки культивирования и дальнейшим выходом на стационар.

Таким образом, предлагаемая модель может быть использована для прогнозирования динамики содержания пигментов при культивировании микроводорослей с заданной внешней освещённостью, но при этом должны быть известны значения видоспецифичных коэффициентов. Следует отметить, что при использовании данной модели необходимо соблюдать условие экспоненциального роста плотности накопительной культуры микроводорослей. В противном случае возможны отклонения экспериментальных данных от теоретической кривой (7.7), которые связаны с наличием ограничения роста культуры микроводорослей либо по свету, либо по газовому обеспечению, либо по минеральному питанию. Высокое соответствие теоретических и экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что именно при учёте процессов фотодеструктивного окисления пигментов с возможностью их последующего восстановления можно объяснить явление «ложного старта» динамики относительного содержания пигментов при культивировании микроводорослей.

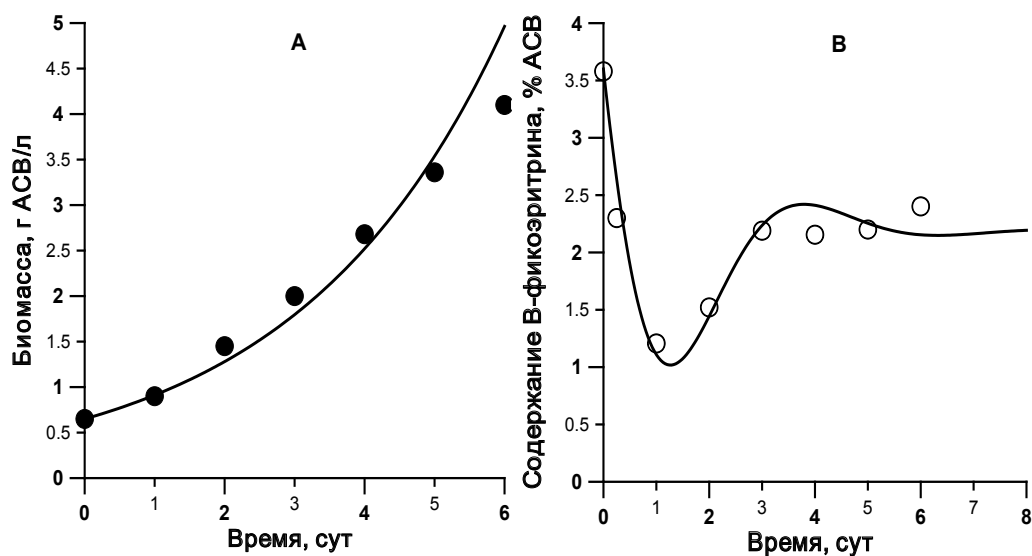


Рисунок 7.6. Динамика биомассы (А) и относительного содержания В-фикоэритрина (В) при переносе клеток *P. purpureum* с низкой на высокую освещённость [Гудвилович, Лелеков, 2008]. Аппроксимация динамики биомассы уравнением (2.2), относительного содержания В-фикоэритрина уравнением (7.7)

Figure 7.6. Dynamics of the biomass (A) and relative content B-phycoerythrin (B) *P. purpureum* cells transferring from low to high illuminance [Гудвилович, Лелеков, 2008]. Approximation of the biomass dynamics equation (2.2), the relative content of the B-phycoerythrin equation (7.7)

ГЛАВА 8

Темновые процессы в культурах микроводорослей

К настоящему времени можно уверенно говорить об экспериментальном подтверждении уменьшения плотности культур микроводорослей при относительно длительном (часы) нахождении клеток в темноте. Это явление тесно связано с темновым дыханием и получило название «night biomass loss – ночная потеря биомассы», которая за ночное время может достигать 14 % [Galloway, Rolle, Soeder, 1974; Geider, Osborne, 1989; Grobbelaar, Soeder, 1985; Morris, Glover, Yentsch, 1974; Raven, Beardall, 2005]. В литературе практически отсутствуют сведения о динамике этих потерь, но рассматривая темновую потерю биомассы как процесс окисления части биомассы клеток, можно косвенно судить о скорости потерь по скорости потребления кислорода культурой микроводорослей. Такого рода измерений достаточно много. Показано, что интенсивность темнового дыхания микроводорослей зависит от предыстории культуры (плотности, освещенности, температуры, продуктивности) и темновых условий (температуры, концентрации кислорода, стадии жизненного цикла, времени нахождения в темноте) [Grobbelaar, Soeder, 1985; Ни, Guterman, Richmond, 1996; Morris, Glover, Yentsch, 1974; Torzillo, Sacchi, Materassi et al., 1991]. Динамика интенсивности дыхания характеризуется наивысшей скоростью в момент перехода в темновой режим, здесь скорость определяется предшествующими световыми условиями; со временем скорость уменьшается, стабилизируясь через 8-12 часов на минимальном уровне [Brown, Webster, 1953; Grobbelaar, Soeder, 1985; Handa, 1969; Markager, Sand-Jensen, 1989]. В экспериментах с пробами озёрного планктона падение скорости дыхания в темноте не зависело от предварительной световой экспозиции, уменьшалось со временем по экспоненциальному закону с удельной скоростью 0.3 ч^{-1} . Вместе с тем экспериментально показано, что при содержании клеток в темноте более 8-12 часов скорость дыхания не остается постоянной, а снижается с удельной скоростью примерно в десять раз меньшей, – около $0,04 \text{ ч}^{-1}$ [Markager, Sand-Jensen, 1989].

Уменьшение биомассы микроводорослей в темноте закономерно вызывает вопрос о том, какие органические вещества в первую очередь окисляются в процессе темнового дыхания. Экспериментально установлено, что наибольшая темновая потеря биомассы происходит за счёт уменьшения углеводов. Так, в работе с плотной культурой спироулины при её выращивании в естественном свето-темновом цикле было обнаружено, что за ночь содержание углеводов в органической массе уменьшалось почти вдвое, с 34 до 19 %, а содержание белка увеличивалось с 57 до 71 % при

незначительном уменьшении доли липидов [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]. В течение дня пропорции биохимических компонентов клеток возвращались к исходным величинам. Аналогичные данные были получены и для планктонных водорослей, причем авторы наблюдали прямую корреляцию между уменьшением углеводов и скоростью дыхания [Markager, Sand-Jensen, 1989]. Все эти результаты могут быть объяснены исходя из механизма ассимиляции углерода у микроводорослей и накопления клетками углеводов как резервных веществ, окисляющихся в процессе дыхания [Чиков, 1987; Morris, Glover, Yentsch, 1974].

На основе этих известных обобщений рассмотрим количественные модели динамики темновой потери биомассы и трансформации биохимического состава клеток микроводорослей.

Кинетика дыхания. Рассмотрим биомассу микроводорослей (B), как совокупность её составляющих. Наиболее общий биохимический состав обычно определяется суммой белков (B_{CN}), углеводов (B_{CH}), липидов (B_{CP}) и зольного остатка (B_M):

$$B = B_{CN} + B_{CH} + B_{CP} + B_M.$$

В момент помещения клеток в темноту биохимический состав будет определяться предысторией. Обозначим этот состав в виде балансового уравнения:

$$B_0 = B_{CN}^0 + B_{CH}^0 + B_{CP}^0 + B_M.$$

Углеводную часть биомассы можно представить как сумму структурно связанных (B_{CH}^{str}) и запасных веществ (B_{CH}^r):

$$B_{CH} = B_{CH}^{str} + B_{CH}^r.$$

Введём обозначения для начального момента времени:

$$B_{CH}^0 = B_{CH}^{0str} + B_{CH}^{0r}.$$

Считая, что скорость окисления резервных углеводов не лимитируется концентрацией кислорода, а зависит только от концентрации самих резервных углеводов, можно записать:

$$-\frac{dB_{CH}^r}{dt} = \mu_r^{CH} \cdot B_{CH}^r.$$

Здесь знак минус означает, что в результате окисления количество углеводов уменьшается со временем t , а μ_r^{CH} представляет собой константу реакции или удельную скорость окисления.

Так как окисление углеводов сопровождается поглощением кислорода (дыханием), то скорость дыхания (V_{CH}) можно выразить через скорость уменьшения концентрации углеводов и стехиометрический коэффициент (ι_{CH}):

$$V_{CH} = -\frac{dO_{2CH}}{dt} = -\iota_{CH} \cdot \frac{dB_{CH}^r}{dt} = \mu_r^{CH} \cdot \iota_{CH} \cdot B_{CH}^r.$$

Максимальная скорость окисления углеводов будет наблюдаться в начальный момент темнового периода, когда в клетках находится наибольшее содержание резервных углеводов (B_{CH}^{0r}):

$$V_{CH}^m = -\left(\frac{dO_{2CH}}{dt}\right)_m = -\left(\iota_{CH} \cdot \frac{dB_{CH}^r}{dt}\right)_m = \mu_r^{CH} \cdot \iota_{CH} \cdot B_{CH}^{0r}$$

Здесь необходимо сделать замечание. Данная модель фактически отражает представления о дыхании как процессе окисления резервных углеводов, что согласуется с результатами цитированных работ. Однако в отдельных работах приведены данные о двух обнаруженных явлениях, которые приводятся, но практически не объясняются. Так с увеличением темнового промежутка, скорость поглощения кислорода вначале резко снижается, но через 8-12 часов переходит на более плавное снижение с удельной скоростью почти на порядок меньшей [Markager, Sand-Jensen, 1989]. Другое явление состоит в том, что за ночной промежуток уменьшается содержание липидов в клетке [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]. Сопоставляя эти данные можно предположить, что параллельно с окислением углеводов происходит окисление липидов, но удельная скорость их окисления намного ниже. Запишем этот процесс в виде выражений, которые полностью аналогичны полученным для углеводов, но с другими индексами:

$$B_{CP} = B_{CP}^{str} + B_{CP}^r,$$

$$B_{CP}^0 = B_{CP}^{0str} + B_{CP}^{0r},$$

$$-\frac{dB_{CP}^r}{dt} = \mu_r^{CP} \cdot B_{CP}^r,$$

$$V_{CP} = -\frac{dO_{2CP}}{dt} = -\iota_{CP} \cdot \frac{dB_{CP}^r}{dt} = \mu_r^{CP} \cdot \iota_{CP} \cdot B_{CP}^r,$$

$$V_{CP}^m = -\left(\frac{dO_{2CP}}{dt}\right)_m = -\left(\iota_{CP} \cdot \frac{dB_{CP}^r}{dt}\right)_m = \mu_r^{CP} \cdot \iota_{CP} \cdot B_{CP}^{0r}.$$

Построенная кинетическая модель представлена дифференциальными уравнениями, в которых коэффициенты имеют строгий смысл и позволяют в целом описать процесс дыхания микроводорослей. Кроме того, эти уравнения можно представить в интегральной форме, что позволит оценить относительные скорости процессов и получить уравнения, описывающие изменение скоростей и биохимический состав во времени.

8.1. Динамика интенсивности дыхания в темноте

Рассмотрим уравнение для скорости изменения углеводов в биомассе клеток. Эта скорость не зависит от содержания белков, липидов

и зольности. Следовательно, уравнение можно проинтегрировать путем разделения переменных при начальных условиях:

$$t = 0, B_{CH}^r = B_{CH}^{0r},$$

$$\int_{B_{CH}^{0r}}^{B_{CH}^r} \frac{dB_{CH}^r}{B_{CH}^r} = -\mu_r^{CH} \cdot \int_0^t dt,$$

$$\ln(B_{CH}^r) - \ln(B_{CH}^{0r}) = -\mu_r^{CH} \cdot t,$$

$$\frac{B_{CH}^r}{B_{CH}^{0r}} = e^{-\mu_r^{CH} \cdot t},$$

$$B_{CH}^r = B_{CH}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}.$$

Теперь можно записать уравнение для динамики скорости дыхания за счет окисления углеводов в виде:

$$V_{CH} = -\frac{dO_{2CH}}{dt} = \mu_r^{CH} \cdot \iota_{CH} \cdot B_{CH}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}.$$

Учитывая что:

$$\mu_r^{CH} \cdot \iota_{CH} \cdot B_{CH}^{0r} = V_{CH}^m,$$

полученное уравнение примет вид:

$$V_{CH} = V_{CH}^m \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t},$$

или в нормированном относительно максимальной скорости виде:

$$V_{CH}^{norm} = \frac{V_{CH}}{V_{CH}^m} = e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}.$$

Аналогичным образом получим динамические уравнения для окисления липидов в темноте и скорости дыхания при этом процессе:

$$B_{CP}^r = B_{CP}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CP} \cdot t},$$

$$V_{CP} = -\frac{dO_{2CP}}{dt} = \mu_r^{CP} \cdot \iota_{CP} \cdot B_{CP}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CP} \cdot t},$$

$$\mu_r^{CP} \cdot \iota_{CP} \cdot B_{CP}^{0r} = V_{CP}^m,$$

$$V_{CP}^{norm} = \frac{V_{CP}}{V_{CP}^m} = e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}.$$

Общая скорость дыхания будет равна сумме скоростей окисления углеводов и липидов:

$$V = -\frac{dO_2}{dt} = V_{CH} + V_{CP},$$

$$V = V_{CH}^m \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t} + V_{CP}^m \cdot e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}.$$

Отношение максимальных скоростей для липидов и углеводов:

$$\frac{V_{CP}^m}{V_{CH}^m} = \frac{\mu_r^{CP} \cdot I_{CP} \cdot B_{CP}^{0r}}{\mu_r^{CH} \cdot I_{CH} \cdot B_{CH}^{0r}}$$

Максимальная суммарная скорость поглощения кислорода:

$$V_m = V_{CH}^m + V_{CP}^m.$$

Количественное описание экспериментальных данных. Полученные модели позволяют дать оценку характера динамических кривых для скорости дыхания, изменения биохимического состава клеток и темновой потери биомассы. Точное количественное описание динамики этих процессов возможно только при известных коэффициентах модели, измеренных независимым образом, однако даже при наличии их примерных значений появляется возможность оценить как характер зависимостей, так и количественные соотношения между коэффициентами.

В качестве экспериментальных данных используем результаты измерения темновой потери биомассы спироулины, выращенной в культуре при естественном освещении [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991] и искусственном освещении со светотемновым режимом 16 ч : 8 ч (свет : темнота) [Авсиян, 2014]. В работе [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991] приведены результаты измерения состава биомассы спироулины в момент захода солнца и на рассвете (табл. 8.1). Таблица дополнена столбцом с нашими расчетами разности в содержании биохимических компонентов (потери*).

Углеводы. Рассмотрим изменение количества углеводов за ночной промежуток времени. В табл. 8.1 дано общее количество углеводов в момент начала темнового промежутка времени (закат) – 394 мг·л⁻¹, и в конце этого промежутка (на рассвете) – 195 мг·л⁻¹. Динамика уменьшения углеводов авторами не исследовалась, но учитывая, что это уменьшение прямопропорционально скорости дыхания и удельная скорость дыхания для естественного фитопланктона равна 0,3 ч⁻¹ [Markager, Sand-Jensen, 1989], примем, что количество углеводов уменьшается с удельной скоростью около 0,3 ч⁻¹. Аналогичные величины получены и в опытах с культурой зеленых микроводорослей при изучении влияния интенсивности света и температуры; авторами было показано, что скорость дыхания зависит от условий выращивания, но скорость уменьшается по экспоненциальному закону и стабилизируется через 8-12 часов темновой экспозиции, что говорит о примерно такой же величине удельной скорости [Grobbelaar, Soeder, 1985].

Следующий шаг в моделировании состоит в учете того, что практически для всех растений общепринятым считается наличие двух форм углеводов – структурных и резервных. И только резервные углеводы окисляются с образованием макроэргов, обеспечивая энергию и углеродные скелеты для темновых процессов, включая синтез белков и других структурных образований [Чиков, 1987]. Заметим, что в одной из моделей фотосинтеза и дыхания микроводорослей пул углерода представлен суммой его содержания в четырёх компартаментах, один из которых является структурным [Laws, Chalup, 1990].

Таблица 8.1. Изменение общего состава биомассы спирулины в начале и конце светового промежутков времени по данным из работы [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]
 Table 8.1. Changes in total composition of Spirulina biomass at the beginning and in the end of light period [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]

Компоненты	Содержание, мг·л ⁻¹			Потери*, мг·л ⁻¹
	восход	заход	восход	
органическое вещество	686	1165	998	-167
белок	486	666	707	+41
углеводы	133	394	195	-199
липиды	66	105	96	-9

Ранее мы получили формулу динамики расхода резервных углеводов. Взяв за основу удельную скорость окисления ($\mu_r^{CH}=0,3 \text{ ч}^{-1}$), мы получим, что в этом случае за 8-12 часов почти все резервные углеводы (B_{CH}^{0r}) должны окислиться и к восходу солнца останутся только структурные (B_{CH}^{0str}). Баланс углеводов для начала темнового периода (табл. 8.1):

$$t = 0,$$

$$B_{CH}^0 = B_{CH}^{0r} + B_{CH}^{0str},$$

$$B_{CH}^{0r} = B_{CH}^0 - B_{CH}^{0str} = 394 - 195 = 199 \text{ мг·л}^{-1}.$$

Зависимость общего содержания углеводов в культуре от времени темновой экспозиции будет описываться выражением:

$$B_{CH} = B_{CH}^{0str} + B_{CH}^r,$$

$$B_{CH}^r = B_{CH}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t},$$

$$B_{CH} = B_{CH}^0 - B_{CH}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}).$$

Взяв за начало координат время захода солнца, содержание общих углеводов в начале ночного промежутка времени и потери за ночь, получим формулу для динамики углеводов в культуре:

$$t = 0, B_{CH}^0 = 394, B_{CH}^{0r} = 199,$$

$$B_{CH} = 394 - 199 \cdot (1 - e^{-0,3 \cdot t}).$$

Расчетные кривые с конечными экспериментальными точками из табл. 8.1 приведены на рис. 8.1.

Полученные формулы позволяют описать динамику скорости дыхания микроводорослей в темноте. Подставляя известный стехиометрический коэффициент для реакции окисления углеводов ($\iota_{CH} = 0,82 \text{ мл}(\text{O}_2) \cdot \text{мг}^{-1}$) в формулу для скорости окисления углеводов, получим зависимость скорости от времени темновой экспозиции:

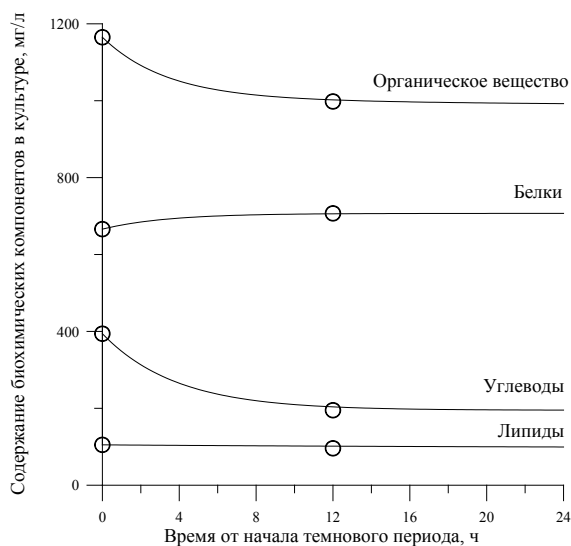


Рисунок 8.1. Динамика биохимических составляющих спирулины, рассчитанная по модельным уравнениям. Экспериментальные точки взяты из работы [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]. (Пояснения в тексте)

Figure 8.1. Dynamics of *Spirulina* biochemical components calculated with model equations. Experimental data are from [Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]. (See explanations in the text)

$$V_{CH} = V_{CH}^m \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t},$$

$$V_{CH}^m = \mu_r^{CH} \cdot t_{CH} \cdot B_{CH}^{0r} = 0.3 \cdot 0.82 \cdot 199,$$

$$V_{CH}^m = 48,95 \text{ мл}(\text{O}_2)\text{л}^{-1}\text{ч}^{-1},$$

$$V_{CH} = 48,95 \cdot e^{-0,3 \cdot t}.$$

Липиды. Рассуждая аналогичным образом, для объяснения ночного уменьшения липидов (табл. 8.1) в первую очередь необходимо определить-ся с величиной удельной скорости их окисления или трансформации в другие продукты. На этот счёт нам не удалось найти экспериментальные данные для микроводорослей. В самом грубом приближении можно предположить, что наблюдаемое медленное темновое дыхание [Grobbelaar, Soeder, 1985; Markager, Sand-Jensen, 1989] при полном исчерпании резервных углеводов определяется именно окислением липидов. В таком случае удельную скорость уменьшения липидов можно принять равной удельной скорости дыхания. Для фитопланктона медленная составляющая удельной скорости дыхания составляет около $0,04 \text{ ч}^{-1}$ [Markager, Jespersen, Madsen et al., 1992]. Сделаем оценку скорости окисления запасных липидов, как фактора определяющего темновое дыхание после 8-12 часов нахождения клеток в темноте.

Воспользовавшись данными из таблицы 8.1, и приняв удельную скорость окисления липидов равной удельной скорости медленной составляющей для дыхания фитопланктона, можно определить содержание резервных липидов по формуле:

$$B_{CP} = B_{CP}^{str} + B_{CP}^r, B_{CP}^0 = B_{CP}^{0str} + B_{CP}^{0r},$$

$$B_{CP}^r = B_{CP}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CP} \cdot t},$$

$$B_{CP} = B_{CP}^0 - B_{CP}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}),$$

$$B_{CP}^{0r} = \frac{B_{CP}^0 - B_{CP}}{1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}}.$$

Подставляя конкретные данные, получим:

$$t = 0, B_{CP} = B_{CP}^0 = 105,$$

$$t = 12, B_{CP} = 96,$$

$$B_{CP}^{0r} = \frac{B_{CP}^0 - B_{CP}}{1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}} = \frac{105 - 96}{1 - e^{-0,04 \cdot 12}},$$

$$B_{CP}^{0r} \cong 24 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}.$$

В результате получим формулу для описания динамики липидов в темноте:

$$B_{CP} = 105 - 24 \cdot (1 - e^{-0,04 \cdot t}).$$

Рассчитанная по этой формуле кривая вместе с начальной и конечной экспериментальной точкой (табл. 8.1) показана на рис. 8.1.

Полученная формула позволяет рассчитать скорость поглощения кислорода при окислении липидов. Для этого применим общепринятый стехиометрический коэффициент ($\iota_{CP} = 1.97 \text{ мл}(\text{O}_2) \cdot \text{мг}^{-1}$), тогда скорость дыхания будет описываться полученным нами уравнением:

$$V_{CP} = V_{CP}^m \cdot e^{-\mu_r^{CP} \cdot t},$$

$$V_{CP}^m = \mu_r^{CP} \cdot \iota_{CP} \cdot B_{CP}^{0r} = 0,04 \cdot 1,97 \cdot 24,$$

$$V_{CP}^m \cong 1,89 \text{ мл}(\text{O}_2) \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1},$$

$$V_{CP} = 1,89 \cdot e^{-0,04 \cdot t}.$$

Через 12 часов скорость дыхания будет равна:

$$V_{CP} = 1,89 \cdot e^{-0,04 \cdot 12} = 1,17 \text{ мл}(\text{O}_2) \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}.$$

Разделив полученную величину на плотность органического вещества в культуре на рассвете, $998 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (табл. 8.1), мы получим величину скорости дыхания, отнесенную к единице биомассы ($1,17 \text{ мкл}(\text{O}_2) \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$). С учетом зольности микроводорослей (примерно 10 %) эта величина полностью совпадает с известными литературными данными о медленной составляющей скорости дыхания фитопланктона.

Сделаем оценку суммарной максимальной скорости дыхания культуры в начальный период темнового процесса. По полученным ранее формулам для данных из табл. 8.1, максимальная скорость дыхания в начале темнового периода:

$$V_m = V_{CH}^m + V_{CP}^m = 48,95 + 1,89,$$

$$V_m = 50,84 \text{ мл}(\text{O}_2) \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}.$$

Разделив эту величину на плотность органического вещества при наступлении темноты ($1165 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), получим:

$$\frac{V_m}{B_0} = \frac{50,84 \text{ мл}(\text{O}_2) \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}}{1165 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}} = 43,6 \text{ мкл}(\text{O}_2) \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}.$$

В перерасчёте на сухую массу клеток получим около $40 \text{ мкл}(\text{O}_2) \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, которая полностью подтверждается экспериментальными данными для плотной культуры спироулины [Hu, Guterman, Richmond, 1996].

Белки. Рассмотрим также экспериментально зарегистрированное увеличение белков во время темнового промежутка времени при естественном свето-темновом режиме выращивания микроводорослей. Это явление подтверждено также в экспериментах с фитопланктоном [Cuhel, 1984; Handa, 1969] и синхронной культурой микроводорослей [Galloway, Rolle, Soeder, 1974]. Эти результаты не противоречат современным представлениям о дыхании растений как процессе окисления «избытка» углеводов с образованием предшественников аминокислот [Чиков, 1987].

Примем, что синтез белка произошёл за счет резервных углеводов. Тогда можно вычислить экономический коэффициент, определяя его как отношение (синтезированный белок) / (расход углеводов). Из таблицы находим его численное значение:

$$Y_{CH}^{CN} = -\frac{B_{CN}}{B_{CH}} = -\frac{41}{199} = -0,21.$$

Здесь знак минус подчеркивает разнонаправленность процессов. При прочих нелимитирующих факторах скорость темнового синтеза белка будет пропорциональна количеству резервных углеводов:

$$\frac{dB_{CN}^r}{dt} = \mu_r^{CN} \cdot Y_{CH}^{CN} \cdot B_{CH}^r = \mu_r^{CN} \cdot Y_{CH}^{CN} \cdot B_{CH}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t},$$

$$\frac{dB_{CN}^r}{dt} = \mu_r^{CN} \cdot B_{CN}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t},$$

где μ_r^{CN} – константа реакции.

Интегрируя последнее уравнение при начальных условиях:

$$t = 0, B_{CN}^r = 0,$$

$$\int_0^{B_{CN}^r} dB_{CN}^r = \mu_r^{CN} \cdot B_{CN}^{0r} \cdot \int_0^t e^{-\mu_r^{CH} \cdot t} dt,$$

$$B_{CN}^r \Big|_0^{B_{CN}^r} = -\frac{\mu_r^{CN} \cdot B_{CN}^{0r}}{\mu_r^{CH}} \cdot e^{-\mu_r^{CH} \cdot t} \Big|_0^t,$$

$$B_{CN}^r = \frac{\mu_r^{CN}}{\mu_r^{CH}} \cdot B_{CN}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}).$$

Прирост белка приведен в табл. 8.1. Учитывая постоянство удельной скорости дыхания, мы можем принять, что:

$$\mu_r^{CN} = \mu_r^{CH} = 0,3, \quad B_{CN}^{0r} = 41,$$

тогда формула для описания динамики белка в темновом процессе будет иметь вид:

$$B_{CN} = B_{CN}^0 + B_{CN}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}),$$

$$B_{CN} = 666 + 41 \cdot (1 - e^{-0,3 \cdot t}).$$

Расчёт по этому уравнению также приведен на рис. 8.1.

8.2. Темновая потеря биомассы

Из полученных моделей следует, что темновая потеря биомассы представляет собой сложную совокупность окислительных и синтетических процессов в клетках микроводорослей. Вместе с тем, темновая потеря биомассы может включать и другие деструктивные процессы [Hu, Guterman, Richmond, 1996; Torzillo, Sacchi, Materassi, 1991]. Сделаем оценку темновой потери биомассы на основе предложенных уравнений с использованными коэффициентами. Динамика суммарного изменения органического вещества в клетках микроводорослей будет описываться уравнением:

$$B = B_{CN} + B_{CH} + B_{CP}.$$

Подставляя полученные нами зависимости для каждого компонента, имеем формулы для описания динамики изменения органической массы (табл. 8.1):

$$B_{CH} = 394 - 199 \cdot (1 - e^{-0,3 \cdot t}),$$

$$B_{CP} = 105 - 24 \cdot (1 - e^{-0,04 \cdot t}),$$

$$B_{CN} = 666 + 41 \cdot (1 - e^{-0,3 \cdot t}),$$

$$B = 983 + 158 \cdot e^{-0,3 \cdot t} + 24 \cdot e^{-0,04 \cdot t}.$$

Расчёт по приведенной формуле показан на рис. 8.1.

Полученные уравнения позволяют также проследить динамику темновых потерь биомассы за счёт дыхания, но с учётом синтеза белков:

$$B_0 - B = B_{CH}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}) + B_{CP}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}) - \frac{\mu_r^{CN}}{\mu_r^{CH}} \cdot B_{CN}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}).$$

Воспользуемся экспериментальными данными снижения биомассы спирулины в темноте, представленными в работе [Авсиян, 2014]. Для количественного описания табличных данных уравнение темновой потери биомассы можно упростить. Для этого используем экономический коэффициент, тогда уравнение примет вид:

$$B_{CN}^{0r} = Y_{CH}^{CN} \cdot B_{CH}^{0r} = 0,21B_{CH}^{0r},$$

$$B_0 - B = B_{CH}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}) + B_{CP}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}) - \frac{\mu_r^{CN}}{\mu_r^{CH}} 0,21 \cdot B_{CH}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}),$$

$$B_0 - B = B_{CH}^{0r} \cdot (1 - 0,21 \frac{\mu_r^{CN}}{\mu_r^{CH}}) (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}) + B_{CP}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}).$$

Таблица 8.2. Экспериментальные данные по динамике плотности культуры микроводорослей в темновом процессе [Авсиян, 2014] и расчетные данные по темновой потере биомассы
Table 8.2. Experimental data of microalgae culture density dynamics in the dark [Авсиян, 2014] and calculated data of dark biomass loss

Время нахождения в темноте, час	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Оптическая плотность, D_{750}	1,61	1,56	1,51	1,52	1,51	1,49	1,48	1,47	1,47
Плотность культуры, г(АСВ)·л ⁻¹	1.04	0.99	0.97		0.96		0.96		0.96
Потери, мг · л ⁻¹	0	53	74		80		83		85

Также можно принять:

$$\frac{\mu_r^{CN}}{\mu_r^{CH}} = 1,$$

тогда:

$$B_0 - B = 0,79B_{CH}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CH} \cdot t}) + B_{CP}^{0r} \cdot (1 - e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}),$$

или:

$$B_0 - B = 0,79 \cdot B_{CH}^{0r} + B_{CP}^{0r} - 0,79 \cdot B_{CH}^{0r} e^{-\mu_r^{CH} \cdot t} - B_{CP}^{0r} \cdot e^{-\mu_r^{CP} \cdot t}.$$

На рис. 8.2 показано соответствие расчётных и экспериментальных данных по темновой потере биомассы. Так как автором не изучался биохимический состав клеток, коэффициенты уравнения определялись с помощью математического моделирования. Оказалось (рис. 8.2), что наилучшим образом экспериментальные точки описываются при соотношении резервных углеводов к липидам как 5 к 1, а удельная скорость окисления углеводов в пятнадцать раз превышает таковую для липидов. Эти результаты не противоречат известным данным, но требуют более тщательных дальнейших исследований.

Таким образом, на основе известных данных о темновом дыхании и экспериментальных сведений о темновой потере биомассы построена обобщённая количественная модель кинетики и динамики темновых процессов в клетках микроводорослей. Модель позволяет описать динамику изменения биохимических составляющих: углеводов, белков и липидов в темновых условиях содержания культуры микроводорослей, динамику интенсивности дыхания клеток в темноте. Применяя усредненные значения

для величин удельной скорости поглощения кислорода, полученные различными авторами в опытах с естественным фитопланктоном, удалось с хорошей точностью описать экспериментальные результаты, полученные при работах с культурами микроводорослей. Кроме того, получены предельные оценки для максимальных и минимальных значений интенсивности дыхания, которые практически полностью совпадают с экспериментальными оценками этих величин, измеренных различными авторами.

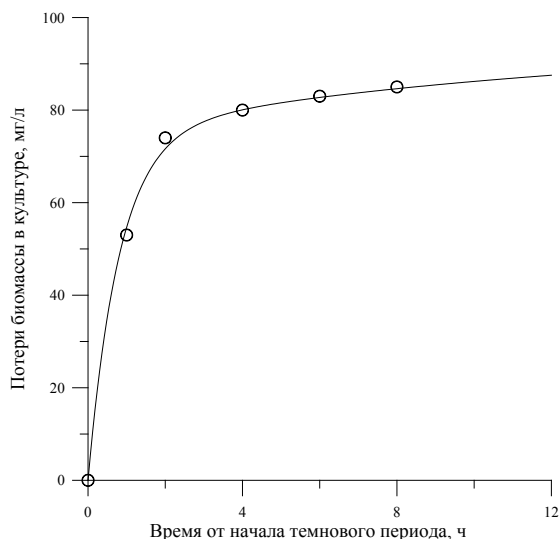


Рисунок 8.2. Зависимость темновой потери биомассы от времени содержания спирулины в темноте (табл. 8.2). Точки – экспериментальные данные, сплошная кривая – расчёт по уравнению
Figure 2. Dependence of dark biomass loss on the time of dark (tabl. 8.2) . Points are the experimental data, continuous curve is the calculation by equation

Вместе с тем, необходимо подчеркнуть некоторые моменты, связанные с предположениями, использованными авторами для построения модели. Положение о том, что медленная составляющая удельной скорости дыхания связана с окислением липидов, взята авторами для удобства моделирования и не подкреплена данными о механизме их окисления. В реальности возможен случай, когда быстро- и медленноокисляющиеся компоненты клеток могут входить и в резервные углеводы и в липиды. В этом случае модель необходимо будет уточнить, но характер зависимостей при этом не изменится, что является основной целью при моделировании интенсивности дыхания и скорости темновых потерь биомассы в целом. Но такой комбинированный механизм окисления может оказаться существенным при расчёте процессов управления культурой микроводорослей при получении конкретных продуктов синтеза в биотехнологических процессах.

Требуют дополнительного изучения и уточнения также коэффициенты полученных уравнений, так как они существенно зависят и от предыстории микроводорослей и от физико-химических условий содержания клеток в темноте.

ГЛАВА 9

Культура микроводорослей как модельный объект в гидроэкологии

Впечатляющие успехи в изучении водных экосистем, достигнутые в двадцатом веке, во многом связаны с исследованиями организмов, выделенных в культуру. Главным достоинством использования культур является возможность получения воспроизводимых результатов, которые позволяют находить не только закономерности влияния экологических факторов среды на выращиваемые объекты, но и дать количественную оценку этого влияния. Без этих данных невозможно изучение метаболических процессов, происходящих на клеточном, организменном или популяционном уровнях.

Спектр культивируемых гидробионтов довольно широк и обусловлен как требованиями практики, например, аквакультуры, так и фундаментальными научными проблемами. В последнем случае исследования проводят с объектами, удобными для решения конкретных научных задач. Наиболее успешным примером в этом отношении можно назвать микроводоросли. Достаточно сказать, что основные достижения в изучении первичных процессов фотосинтеза получены в экспериментах именно на культурах микроводорослей. Кроме того, работы с культурами микроводорослей незаменимы при оценке первичной продукции водоёмов. Иными словами, культура микроводорослей является прекрасным модельным объектом в гидроэкологических исследованиях.

К настоящему времени накоплен большой опыт работы по введению микроводорослей в культуру, определены основные характеристики роста. Изучены потребности клеток в биогенных макро- и микроэлементах, диапазоны рН, освещённостей и температур, условия газообмена. В итоге разработаны техника и питательные среды, обеспечивающие как периодический, так и непрерывный рост водорослей. Особо необходимо указать на хорошее теоретическое обоснование механизмов управления ростом микроводорослей в культуре, которое позволяет не только выявить зависимость характеристик роста от того или иного параметра внешней среды, но и формализовать закономерности с помощью относительно простых математических уравнений. Совокупность достижений в области культивирования микроводорослей и математического моделирования зависимости роста от гидроэкологических параметров среды позволяют рассматривать культуру микроводорослей в качестве удобного модельного объекта для выявления общих закономерностей роста организмов и популяций. Причем эти закономерности могут выполняться не только для гидробионтов, т. е. могут иметь общеэкологическое значение.

Наиболее широкое применение микроводоросли, как модельные объекты в гидроэкологии, могут найти в кинетических исследованиях, к которым относится поиск зависимости скорости роста организма или популяции от потока питательных веществ из водной среды. Такого рода исследования напрямую связаны с решением задач трофодинамики, т. к. одноклеточные организмы играют существенную, а часто и ключевую роль при энерго- и массообмене в трофических цепях. В общем случае, исходя из клеточной теории, любой организм можно рассматривать как популяцию клеток. Следовательно, должны существовать некоторые общие закономерности, определяющие как рост популяции одноклеточных организмов, так и сложный многоклеточный организм.

Важным моментом при изучении кинетики роста микроводорослей является возможность относительно быстрого достижения динамически равновесных состояний в открытых системах, каковыми являются непрерывные культуры микроводорослей. При этом обеспечивается детальное изучение переходных процессов, позволяющее сделать количественную оценку адаптационных явлений. В этом случае главным достоинством микроводорослей как модельного объекта являются их высокая скорость размножения и малые размеры. Удельная скорость роста как пресноводных, так и морских одноклеточных водорослей может достигать $0,3 - 0,4 \text{ ч}^{-1}$, т. е. время генерации составляет часы [Белянин, 1984; Белянин, Сидько, Тренкеншу, 1980; Финенко, Ланская, 1971], а микроскопические размеры клеток позволяют работать с популяциями особей плотностью намного выше млн./мл [Белянин, 1984; Finenko, Hoepffner, Williams et al., 2003]. Эксперименты с такими популяциями можно провести в течение нескольких дней, что невозможно с крупными особями, время генерации которых составляет годы.

Принципы управления культурой микроводорослей, которые позволяют реализовать как максимальные скорости роста (плотностат), так и максимизировать коэффициент использования питательных веществ (хемотрат), разработаны хорошо [Печуркин, Терсков, 1975; Терсков, Гительзон, Сидько и др., 1964; Anderson, 1953; Bannister, 1979; Ketchum, Redfield, 1938]. Кроме того, непрерывные культуры позволяют экспериментально исследовать сукцессионные и автоселекционные процессы. В этой области успешно используется формальный аппарат математического моделирования [Гуревич, 1984; Печуркин, Терсков, 1975; Anderson, 1953; Bryson, 1952; Novick, Szilard, 1957].

В данной работе рассматриваются некоторые частные задачи кинетики и динамики роста и фотобиосинтеза микроводорослей, аналогичные задачам для других водных организмов и при решении которых могут быть использованы подходы и методы, применяемые для исследования микроводорослей.

Исследования в области кинетики роста и динамики популяций в открытых системах можно отнести к актуальным проблемам гидроэкологии. К одной из основных задач относится определение зависимости роста отдельных организмов или популяций от обеспеченности энергией и пита-

тельными веществами. Для решения такого рода задач микроводоросли являются уникальным модельным объектом. Это связано с тем, что источником энергии для микроводорослей является свет, который можно мгновенно отключить, не изменяя другие внешние условия среды.

Рассмотрим основную задачу биокинетики на примере микроводорослей. Наиболее часто употребляемой выходной характеристикой роста является удельная скорость μ , которая не зависит от массы и объема изучаемой популяции. Заметим, что удельная скорость роста является интенсивным параметром. Удельная скорость роста зависит от множества факторов внешней среды, но не может превышать некоторого видоспецифического максимального значения (μ_m), поэтому для сравнительных оценок удобно пользоваться нормированной относительно этого значения величиной удельной скорости роста:

$$\mu_{norm} = \frac{\mu}{\mu_m}.$$

Эта величина может принимать значения от 0 до 1.

Максимальная скорость, с которой может синтезироваться биомасса (или максимальная скорость размножения клеток):

$$P_m = \mu_m \cdot B.$$

Т. е. для условий непрерывного стационарного роста:

$$P_{norm} = \frac{P}{P_m} = \frac{\mu \cdot B}{\mu_m \cdot B} = \mu_{norm}.$$

Согласно принципу лимитирующих факторов Либиха, скорость роста определяется тем элементом питания, который находится в минимуме [Liebig, 1847]. Принцип был обобщен Ф. Блекманом на другие внешние факторы, не связанные с питанием [Blackman, 1905], а Ж. Моно ввел понятие "узкого места" метаболизма, которое в целом ограничивает скорость роста организма [Monod, 1949]. К эквивалентам понятия узкого места можно отнести понятия лимитирующей стадии в химической кинетике или лимитирующего звена в цепи ферментативных реакций [Чернавский, Иерусалимский, 1965]. Чтобы избежать двусмысленности терминологии, разделим понятия лимитирующего фактора и лимитирующего звена (узкого места). Под лимитирующим фактором будем понимать внешний поток энергии или вещества, который ограничивает скорость роста организма. Под узким местом будем подразумевать внутреннюю структуру системы метаболизма, которая ограничивает скорость при полном обеспечении организма энергией или элементами питания. В контексте данной работы кинетической характеристикой узкого места является величина μ_m , определяемая как активность фермента [Диксон, Уэбб, 1982] или транспортной системы.

В узком месте контролируется синтез некоторой составляющей биомассы b_{lim} , без которой невозможны полноценное развитие и рост клеток, т. е. концентрация данного вещества в общей биомассе должна быть не ниже некоторой величины:

$$\psi_{\min} = \frac{b_{\lim}}{B}.$$

Скорость и удельная скорость синтеза этого вещества:

$$P^b = \frac{db_{\lim}}{dt},$$

$$\mu = \frac{db_{\lim}}{b_{\lim} \cdot dt} = \frac{P^b}{b_{\lim}} = \frac{P^b}{\psi \cdot B}.$$

Максимальная скорость синтеза лимитирующей составляющей биомассы будет определяться количеством ферментных, транспортных или аналогичных им структурных образований в клетке, являющихся узким местом, F_0 . Если содержание таких образований в единице биомассы f то максимальная скорость их синтеза:

$$P_m^b = \mu_m \cdot F_0 = \mu_m \cdot f \cdot B.$$

Скорость синтеза будет прямопропорциональна количеству лимитирующих звеньев, занятых в данный момент времени синтезом лимитирующей составляющей биомассы, F :

$$P_m^b = \mu_m \cdot F^*.$$

Т. е. для условий непрерывного стационарного роста будут выполняться следующие соотношения:

$$P_{\text{norm}} = \mu_{\text{norm}} = \frac{P^b}{P_m^b} = \frac{\mu_m \cdot F^*}{\mu_m \cdot F^0} = \frac{F^*}{F^0}.$$

Отметим, что эти соотношения будут выполняться при условии, что не будут изменяться значения f и ψ_{\min} для сравниваемых величин скоростей.

Для стационарного роста все удельные скорости равны:

$$\frac{dB}{B \cdot dt} = \frac{db_{\lim}}{b_{\lim} \cdot dt} = \frac{dF_0}{F_0 \cdot dt}.$$

Отсюда вытекают следующие соотношения:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{1}{\psi_{\min}} \cdot \frac{db_{\lim}}{dt},$$

$$\frac{dF_0}{dt} = \frac{f}{\psi_{\min}} \cdot \frac{db_{\lim}}{dt}.$$

Первое уравнение фактически отражает утверждение о том, что скорость роста определяется скоростью синтеза лимитирующей составляющей биомассы, без которой невозможны полноценное развитие и рост организма. Второе уравнение указывает на то, что скорость синтеза лимитирующих звеньев (узких мест) также прямолинейно зависит от скорости синтеза лимитирующего компонента биомассы.

Если скорость роста определяется внешним лимитирующим фактором, связанным с питанием, то входным параметром будет поток энергии или вещества. В гидрoэкологии чаще всего используют величины концен-

траций лимитирующих элементов в окружающей среде. С термодинамической точки зрения такой подход не вполне корректен, но опосредованно приемлемо изучать кинетические характеристики в зависимости от концентраций, т. к. потоки, являющиеся интенсивными параметрами, можно выразить через концентрации.

Рассмотрим, как зависит скорость синтеза лимитирующей составляющей биомассы от величины потока элементов питания, поступающего в клетку из внешней среды. При лимитировании роста одним из элементов питания скорость роста будет ниже максимальной, и будет определяться величиной потока этого элемента в клетку. В частности, для микроводорослей удельный поток (на единицу площади поверхности) элементов питания из водной среды (λ_Ω) связан с концентрацией этих элементов в среде (S):

$$\lambda_\Omega = K_\lambda \cdot S.$$

где K_λ - коэффициент проницаемости клеточной поверхности для данного питания.

Для клетки, имеющей площадь поверхности σ через которую поступает питание, поток будет равен:

$$\lambda_b = K_\lambda \cdot \sigma \cdot S.$$

Для сравнительных оценок удобнее пользоваться величиной приведённой плотности потока элементов питания, λ . Эта величина показывает количество единиц элементов питания, поступающих на каждую единицу лимитирующего звена, за время, равное времени оборота лимитирующего звена. Учитывая, что время оборота представляет собой величину, обратную активности этой единицы (в нашем случае, μ_m), для приведённой плотности потока можно записать:

$$\lambda = \frac{\lambda_b}{\mu_m \cdot f \cdot b}.$$

Или

$$\lambda = \frac{K_\lambda \cdot \sigma}{\mu_m \cdot f \cdot b} \cdot S = \frac{K_\lambda \cdot \sigma \cdot n}{\mu_m \cdot f \cdot b \cdot n} \cdot S = \frac{K_\lambda \cdot \Omega}{\mu_m \cdot f \cdot B} \cdot S.$$

Здесь $\Omega = \sigma \cdot n$ – общая поверхность всех n клеток (составляющих биомассу, $B = b \cdot n$), через которую поступает лимитирующий поток питания. Заметим, что приведённая плотность потока питания является безразмерной величиной.

Эффективность использования потока питания (φ) характеризуется отношением скорости синтеза лимитирующей составляющей биомассы к величине потока субстрата, обеспечивающего этот синтез, т. е. потока на лимитирующее звено:

$$\varphi = \varphi_m \cdot \frac{\mu}{\lambda \cdot \mu_m}.$$

Здесь φ_t – множитель, показывающий минимальное количество единиц питания, необходимое для получения одной единицы биомассы, или истинная потребность в субстрате (см. главу 4). Для отдельной клетки это отношение можно представить в виде:

$$\varphi = \varphi_t \cdot \frac{\mu \cdot f \cdot b}{\lambda_b}.$$

В нормированном виде получим величину, изменяющуюся от нуля до единицы:

$$\varphi_{\text{норм}} = \frac{\mu_{\text{норм}}}{\lambda}.$$

Отсюда:

$$\mu_{\text{норм}} = \varphi_{\text{норм}} \cdot \lambda.$$

На рис. 9.1 приведены типичные кривые зависимости скорости роста популяции клеток (биомассы) от концентрации питательных веществ в водной среде, представленные в нормированном виде. Здесь же показана зависимость эффективности использования потока питательных веществ организмами, вытекающая из последнего уравнения.

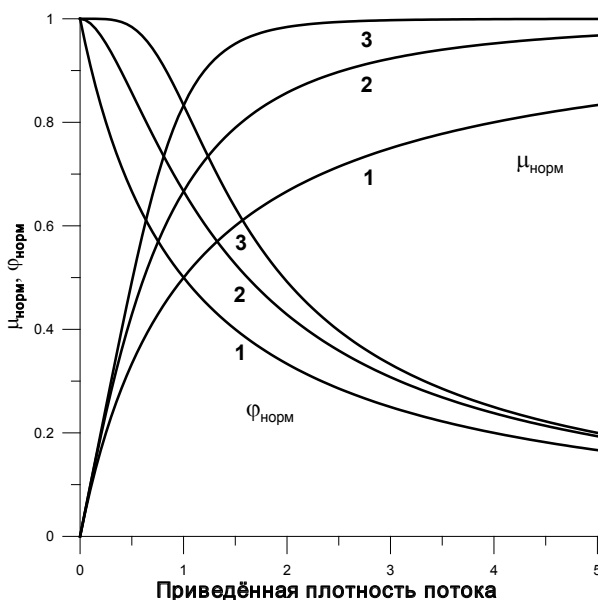


Рисунок 9.1 Типичные формы зависимости скорости роста ($\mu_{\text{норм}}$) и наблюдаемого экономического коэффициента для лимитирующего фактора ($\varphi_{\text{норм}}$) от концентрации пищи (приведенной плотности потока элементов питания, λ) (1, 2, 3 – ёмкость субстратного депо)

Figure 9.1 Typical patterns of growth rate dependence ($\mu_{\text{норм}}$) and the observed economic coefficient for the limiting factor ($\varphi_{\text{норм}}$) on food concentration (reduced density of flux of food elements, λ)

Представление кинетических зависимостей в нормированном виде позволяет сделать оценку организации лимитирующего звена (узкого места) по характеру кривых. Теоретический подход к такой оценке дан в [Тренкеншу, 1988]. В частности, характер кривых определяется ёмкостью депо элементов питания (или промежуточных продуктов) в метаболической цепи перед лимитирующим звеном. На рис. 9.1 видно, что клетки с лучшей организацией метаболических систем (ёмкость депо выше) при равных потоках питания растут быстрее, и с большей эффективностью используют этот поток.

9.1. Микроэволюция

Непрерывная культура микроводорослей представляет собой открытую систему, в которую поступает питательная среда с некоторой удельной скоростью, и с такой же скоростью вытекает суспензия клеток. Для динамически равновесных (стационарных) состояний удельная скорость роста равна удельной скорости протока. Если в какой-то момент времени в культуре появятся клетки с более высокой организацией метаболической системы, то при любых величинах плотности потока питания удельная скорость роста этих клеток будет выше, чем у клеток с низкой организацией. Доля более организованных клеток будет возрастать и, в конце концов, полностью вытеснит клетки с худшей организацией узкого места. Иная картина будет наблюдаться, если в культуре появятся клетки с худшей организацией метаболической системы. Ясно, что такие клетки будут всегда вытесняться из системы культивирования, т. е. в непрерывной культуре происходит автоселекция штаммов с более высокой удельной скоростью роста.

Вернёмся к формуле, связывающей приведённую плотность потока питания в клетку с её геометрией:

$$\lambda = \frac{K_{\lambda} \cdot \sigma}{\mu_m \cdot f \cdot b} \cdot S.$$

Соотношение поверхности клетки и её объёма (выраженного через массу) увеличивается при уменьшении размеров клетки и увеличении её поверхности, что увеличивает поток питания в клетку. Это приводит к увеличению скорости роста, и, соответственно, к автоселекции более мелких клеток или клеток с негладкой поверхностью.

Рассматривая характеристики роста и эффективности при единичном потоке ($\lambda = 1$), можно заметить, что при таком потоке наблюдаются наибольшие различия в значениях скорости и эффективности для систем с разной организацией. Ясно, что микроэволюционные явления будут происходить более быстро при единичных потоках и будут связаны с отбором более организованных систем. Причем стратегия эволюции при единичных потоках будет универсальной, так как отбор будет происходить в сторону оптимального соотношения удельной скорости и эффективности использования субстрата. Это указывает на то, что эти кинетические свойства, рас-

смаатриваемые отдельно, не могут служить характеристиками глобальной стратегии эволюции и являются только частными случаями более общей характеристики. Такой универсальной характеристикой может служить величина, равная произведению скорости на эффективность. Эффективная скорость может быть представлена в нормированном виде:

$$\Lambda_{norm} = \mu_{norm} \cdot \varphi_{norm}.$$

Выражение для эффективной скорости можно записать иначе:

$$\Lambda_{norm} = \frac{\mu_{norm}^2}{\lambda} \cdot \varphi_{norm},$$

$$\Lambda_{norm} = \varphi_{norm}^2 \cdot \lambda.$$

В математическом отношении полученная функция обладает одним очень важным свойством, а именно: эффективная скорость имеет максимум, т. е. может служить универсальной характеристикой микроэволюционных процессов, связанных с отбором наиболее выгодной организации систем. Кроме того, максимум лямбда-функции расположен в точке, соответствующей единичному потоку, т. е. система для реализации наиболее выгодного отбора будет стремиться к этой точке. Анализ и графическое представление полученной функции более подробно рассмотрены в работе [Тренкеншу, 2005].

Зависимости скорости фотосинтеза, измеренные по скорости выделения кислорода и по скорости синтеза биомассы, имеют существенные различия. Неоднозначность можно объяснить тем, что время измерения скорости выделения кислорода занимает минуты, а время для измерения прироста биомассы составляет часы. Причем время достижения динамически равновесного состояния может занимать сутки из-за длительных переходных процессов, связанных с адаптацией к изменившимся световым условиям. Адаптация проявляется в настройке (перестройке) фотосинтетического аппарата клеток к другой интенсивности света [Flynn, 2003; Macintyre, Kana, Anning, Geider, 2002].

Приведем пример анализа световых кривых фотосинтеза с помощью их представления в нормированном виде [Тренкеншу, Вопилова, 1989]. Семейство экспериментальных световых кривых фотосинтеза непрерывной культуры микроводорослей, выращенных при разных интенсивностях действующего света, после достижения ими стационарных значений заданной удельной скорости роста показано на рис. 9.2. Эти же данные, представленные в нормированном виде, представляют собой одну общую кривую (рис. 9.3).

Отсюда следует, что адаптация к изменившимся световым условиям не влияет на структурную организацию лимитирующего звена, а проявляется только в изменении размера фотосинтетической единицы, т. к. данные приведены в расчёте на единицу хлорофилла. Кроме того, расчётные данные позволили оценить ёмкость субстратного депо, которая составляет 3 единицы. Расчётная кривая показана на рис. 9.3 сплошной линией.

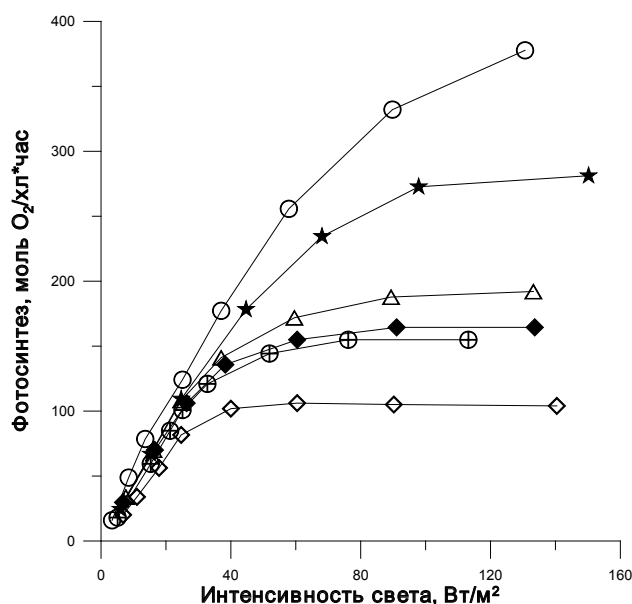


Рисунок 9.2. Зависимость скорости фотосинтеза от интенсивности света для микроводорослей, выращенных в непрерывной хемостатной культуре с разной удельной скоростью протока среды (скорость протока указана цифрами на кривых (1/сутки) [Monod, 1950])
 Figure 9.2. Dependence of photosynthesis rate on light intensity for the microalgae grown in continuous chemostat culture at different specific rate of medium flux. The flux rate is shown by figures on the curves (1/days) [Monod, 1950]

9.2. Динамика популяций

Кинетика популяций рассматривает зависимости роста от факторов внешней среды, не связывая их с движущими силами, определяющими этот рост. Для получения термодинамически корректных описаний динамики роста отдельного организма или популяции необходимо определить движущие силы в виде интенсивных параметров, характеризующих направление процессов в системе, в которой данная популяция развивается. При этом, как правило, скорость процессов пропорциональна разности потенциалов, которая и является движущей силой.

С этой точки зрения величину приведённой плотности потока энергетического питания можно рассматривать в качестве величины потенциала. Действительно, этот параметр является интенсивным, он включает как внешние условия в виде учёта практически всех физико-химических факторов среды через характеристики потока, так и внутренние свойства организма в виде структуры лимитирующего звена и основной кинетической характеристики – максимальной удельной скорости роста (удельный биопотенциал). В этом смысле приведённую плотность потока питания уместно назвать удельным экологическим потенциалом, уточняя термином "экологический" принадлежность данного понятия к совокупности организма и внешней среды и их взаимодействию.

Заметим, что если в уравнении для приведённой плотности потока питания заменить концентрацию элементов минерального питания на их химическую активность, то можно увидеть, что экотенциал прямо пропорционален отношению химического потенциала среды и биопотенциала организма.

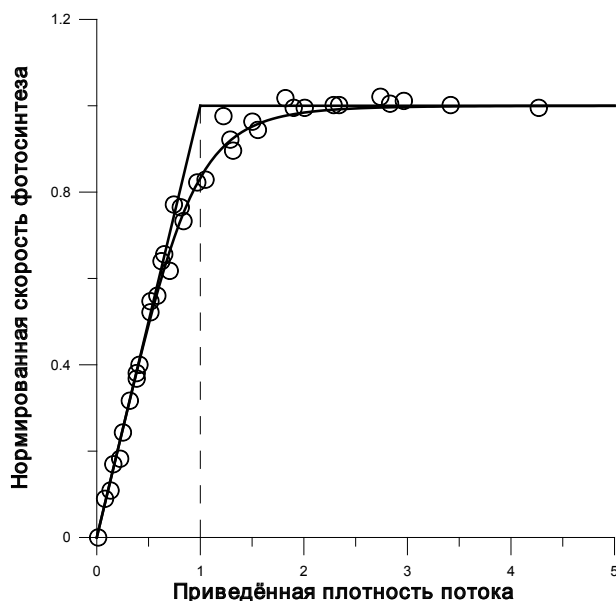


Рисунок 9.3. Зависимость нормированных значений скорости фотосинтеза (P_{norm}) от нормированных значений интенсивности света (приведённой плотности потока квантов световой энергии на один РЦ, λ)

Figure 9.3. Dependence of normalized values of photosynthesis rate (P_{norm}) on normalized values of light intensity (reduced density of quantum flux of light energy per one RC, λ)

Рассмотрим рост популяции в открытой системе на примере непрерывной культуры микроводорослей. Непрерывный рост микроводорослей обеспечивается подачей питательной среды в систему культивирования с некоторой удельной скоростью ω при одновременном отборе равноценного объёма культуры с такой же скоростью. То есть из внешней среды поступает лимитирующий элемент питания со скоростью:

$$\frac{dS}{dt} = \omega \cdot S_0.$$

Прирост биомассы клеток в системе будет уменьшать концентрацию элементов питания (в единицу времени) на величину:

$$-\frac{dS_B}{dt} = \varphi_m \cdot \frac{dB}{dt} = \varphi_m \cdot P.$$

Т. е. в системе концентрация элементов питания будет ниже и вынос элементов питания с протоком будет происходить со скоростью:

$$\frac{dS}{dt} = \omega \cdot S.$$

Скорость изменения концентрации элементов питания в системе будет определяться разностью скорости их подачи и скоростей потребления клетками и выноса с протоком:

$$\frac{dS}{dt} = \omega \cdot S_0 - \omega \cdot S - \varphi_m \cdot P,$$

$$\frac{dS}{dt} = \omega \cdot (S_0 - S) - \varphi_m \cdot P.$$

Для условий стационарного роста получим динамически равновесную систему:

$$\frac{dS^*}{dt} = \omega \cdot (S_0 - S^*) - \varphi_m \cdot P^* = 0.$$

Отсюда находим выражение для продуктивности непрерывной проточной культуры:

$$P^* = \frac{\omega}{\varphi_m} \cdot (S_0 - S^*).$$

Из формулы следует, что продуктивность популяции определяется разностью концентраций пищи на входе и выходе (= внутри) системы культивирования и наоборот. По существу последняя формула представляет собой банальное выражение закона сохранения. Однако градиент концентраций элементов питания указывает на возможность рассматривать уравнение для оценки движущих сил, хотя этот градиент не может рассматриваться в виде движущей силы, т. к. не является интенсивным параметром.

Для получения термодинамически корректного уравнения, достаточно выразить зависимость продуктивности через максимальные и текущие значения приведенной плотности потока питания:

$$\lambda_m = \frac{K_\lambda \cdot \sigma}{\mu_m \cdot f \cdot b} \cdot S_0 = T \cdot S_0,$$

$$\lambda^* = \frac{K_\lambda \cdot \sigma}{\mu_m \cdot f \cdot b} \cdot S^* = T \cdot S^*,$$

$$T = \frac{K_\lambda \cdot \sigma}{\mu_m \cdot f \cdot b},$$

$$P^* = \frac{\omega}{\varphi_m \cdot T} \cdot (\lambda_m - \lambda^*).$$

В итоге получено динамическое уравнение, связывающее продуктивность популяции с градиентом экотенциалов, который является интенсивным параметром и его можно рассматривать в качестве движущей силы. Любые изменения продуктивности определяются либо изменением

скорости обмена с внешней средой (например, изменением скорости потока среды или концентрации элементов питания на входе), либо внутренними свойствами популяции (например, уменьшением коэффициентов использования пищи или изменением структуры и геометрии организма). В последнем случае происходит автоселекция организмов с меньшими значениями обобщенного коэффициента T .

Полученное уравнение можно представить в разных формах:

$$P^* = \frac{\omega}{\varphi_m \cdot T} \cdot (\lambda_m - \lambda^*) = \frac{\omega \cdot \lambda_m}{\varphi_m \cdot T} \cdot \left(1 - \frac{\lambda^*}{\lambda_m}\right),$$

$$\lambda_m = T \cdot \varphi_m \cdot B_m,$$

$$P^* = \omega \cdot B_m \cdot \left(1 - \frac{\lambda^*}{\lambda_m}\right).$$

Обратим внимание, что величина максимальной плотности культуры (B_m) по смыслу может интерпретироваться как величина, носящая в экологии название максимальной поддерживающей ёмкости среды [Одум, 1986]:

$$B_m = \frac{1}{T \cdot \varphi_m} \cdot \lambda_m.$$

Последняя формула показывает, что максимальная поддерживающая ёмкость среды определяется максимальным значением удельного экопотенциала.

Продуктивность культуры можно представить как сумму скоростей отбора биомассы и изменения плотности культуры:

$$P = \omega \cdot B + \frac{dB}{dt}.$$

Для условий динамического равновесия:

$$\frac{dB}{dt} = 0,$$

$$P^* = \omega \cdot B^*.$$

Подставляя последнее выражение в формулу для продуктивности, находим стационарные значения плотности популяции:

$$B^* = B_m \cdot \left(1 - \frac{\lambda^*}{\lambda_m}\right).$$

Ранее отмечалось, что эффективная скорость имеет максимум в точке, соответствующей единичному значению приведённой плотности потока питания или удельного экопотенциала. Плотность культуры в открытой системе всегда изменяется в сторону, обеспечивающую приближение удельного экопотенциала к единице. Действительно, при величине удельного экопотенциала больше единицы, клетки полностью обеспечены питанием и растут с максимальной скоростью. Это приво-

дит к увеличению плотности культуры и уменьшению обеспеченности клеток, т. е. удельный экотенциал уменьшается. Если он уменьшится ниже единицы, то уменьшатся скорость роста и плотность культуры за счёт вымывания с протоком, что приведёт к увеличению удельного экотенциала и соответствующему увеличению скорости роста и плотности.

Отсюда можно сделать важный вывод: авторегуляция в открытой системе происходит таким образом, чтобы обеспечить максимальное значение эффективной скорости роста. Это реализуется путём изменения плотности популяции в сторону, обеспечивающую приближение величины удельного экотенциала к единичному значению. Изменения плотности культуры при изменении условий всегда направлены в сторону компенсации этих изменений таким образом, чтобы приблизить величину приведённой плотности потока питания к единице. Вероятно, мы имеем дело с законом, который можно записать в виде:

$$\frac{dB}{dt} = \omega \cdot B \cdot (\lambda - 1).$$

Рассматривая культуру микроводорослей как модельный объект в гидроэкологических исследованиях, необходимо отметить некоторые существенные моменты, выделяющие микроводоросли как объект, обладающий уникальными свойствами.

Во-первых, многие виды микроводорослей являются облигатными фототрофами. При этом свет является единственным энергетическим субстратом, поток которого в организм можно практически мгновенно остановить, не изменяя другие внешние условия. Это свойство позволило поставить вопрос о временной и структурной организации лимитирующего звена в последовательности преобразования энергии и вещества в клетке. Введение понятия организации в виде величин мульт-центральности и ёмкости субстратного депо показало, что эти величины существенно влияют на кинетику роста организмов. Кроме того, такой подход привел к необходимости введения понятия приведённой плотности потока питания. Это понятие позволяет не только делать сравнительную оценку организации систем метаболизма, но и рассматривать его в качестве величины удельного экотенциала, максимальное значение которого прямо пропорционально величине максимальной поддерживающей ёмкости среды, понятию, используемому в экологии.

Во-вторых, система фотобиосинтеза микроводорослей может быть чётко разделена на две системы: фотосинтеза и биосинтеза. Это свойство микроводорослей позволяет решать задачи, связанные с проблемами энерго- и массообмена в гидробионтах. По крайней мере, разделение систем однозначно указывает на то, что лимитирующим звеном является место сопряжения энергетических и биосинтетических реакций в клетках, где происходит согласование скоростей энерго- и массообме-

на. В третьих, высокая скорость роста микроводорослей и их микроскопические размеры позволяют работать с популяциями высокой плотности, аналогичными микробным, а в совокупности с фототрофными свойствами решать задачи трофодинамики и управления живыми организмами. Рассматривая рост микроводорослей в непрерывной культуре, как открытой системе, удалось показать, что разность между максимальным и текущим значением удельного экотенциала является движущей силой развития популяции. Кроме того, направление развития популяции в открытой системе всегда стремится к значению удельного экотенциала, равному единице, т. е. к величине, при которой нормированное значение эффективной скорости достигает максимума.

Приложение

Математическая модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей

Оптический метод определения биомассы микроводорослей является наиболее простым и широко распространенным [Chen, Vaidyanathan, 2012; Collos, Mornet, Sciandra et. al., 1999]. В его основе лежит основополагающий закон оптики Бугера-Ламберта-Бера, согласно которому оптическая плотность поглощающего раствора прямопропорциональна концентрации растворенного вещества:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot C},$$

где I , I_0 – интенсивность плоской монохроматической выходящей и падающей на слой вещества l световой волны, ε – коэффициент экстинкции, зависящий от свойств растворенного вещества, C – концентрация растворенного вещества.

В клетках низших фототрофов основная доля поглощённого света приходится на фотосинтетические пигменты. Помимо этого, свет поглощают и структурные элементы клеток внутриклеточные компоненты, клеточные мембраны и пр. Поглощение света структурными элементами клеток, не связанное с пигментами, называется неспецифическим [Сидько, Ерошин, 1964]. Коэффициент экстинкции ε (коэффициент ослабления света) определяется как поглощенной, так и рассеянной световой энергией. Рассеяние света в суспензии происходит вследствие дифракции первичного светового пучка из-за чрезвычайной гетерогенности клеток. При необходимости получить именно величину поглощения суспензии клеток используют прибор со специальной приставкой – фотоинтегрирующей сферой, направляющей рассеянные лучи на регистрирующий элемент.

По определению, оптическая плотность раствора на данной длине волны прямопропорциональна концентрации растворенного вещества:

$$D = \varepsilon \cdot l \cdot C.$$

Применительно к культуре микроводорослей, оптическая плотность на длине волны неспецифического поглощения, например 750 нм, прямопропорциональна концентрации клеток в растворе, или биомассе B :

$$D_{750} = \varepsilon \cdot l \cdot B.$$

При постоянстве коэффициента экстинкции ε и фиксированном оптическом пути l , получим линейную взаимосвязь оптической плотности культуры с биомассой микроводорослей:

$$D_{750} = k \cdot B.$$

Однако, вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также для культур высокой плотности, наблюдаются значительные откло-

нения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой микроводорослей [Геворгиз, Алисиевич, Шматок, 2005]. На рисунке П.1 представлена кривая зависимости оптической плотности культуры спироулины *Arthrospira platensis* от её биомассы. Как следует из рисунка, кривая не описывается линейной зависимостью во всем диапазоне данных. В области небольших концентраций клеток, примерно до 0,9 г/л и 0,6 ед. опт. пл., кривая достаточно хорошо описывается линейным уравнением. При нулевом значении биомассы величина оптической плотности также должна равняться нулю, однако полученные результаты свидетельствуют о том, что при нулевой биомассе оптическая плотность должна составлять около 0,03 единиц. Следовательно, даже при малых концентрациях клеток культур микроводорослей применимость закона Бугера-Ламберта-Бера вызывает множество вопросов.

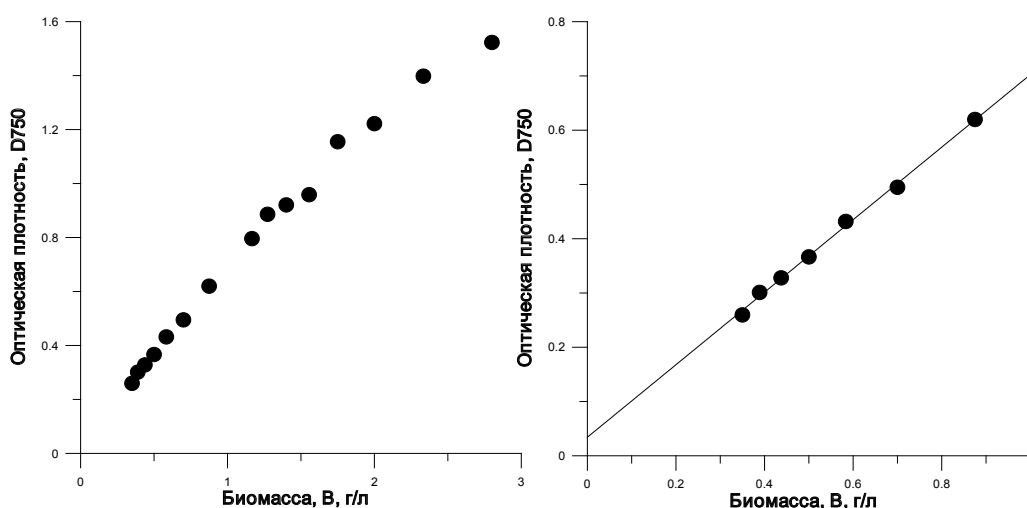


Рисунок П.1. Зависимость оптической плотности культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением линейной регрессии
Figure П.1. The dependence of the optical density *A. platensis* culture by its biomass. Line – approximation of experimental data by linear regression equation

Следует отметить, что величина оптической плотности, указанная на рисунке П.1 рассчитана как отрицательный десятичный логарифм пропускания T . Так как любой оптический прибор определяет именно величину пропускания света, которое есть отношение проходящей световой энергии к падающей, следовательно, при работе с культурами микроводорослей при определении величины оптической плотности необходимо использовать иную зависимость между D и T , нежели в виде десятичного логарифма.

Пусть дана плоскопараллельная кювета, в которой находится культура микроводорослей. Допустим, что клетки представляют собой кубики с площадью боковой грани dS . По литературным данным известно, что одна клетка поглощает около 40 % падающей световой энергии [Фуряев, 1979],

обозначим эту величину через α . Пусть I_0 – интенсивность пучка монохроматического света, падающего на поверхность культуры, Вт/м²; S – площадь поперечного сечения кюветы, I_{np} – интенсивность света, прошедшего сквозь культуру, Вт/м².

Если в кювете находится только одна клетка, то интенсивность поглощенного (I_n) и проходящего через всю поверхность кюветы света будет определяться по формуле:

$$I_n = I_0 \cdot \alpha \cdot \frac{dS}{S}, \quad (\text{П.1})$$

$$I_{np} = I_0 - I_n. \quad (\text{П.2})$$

Подставим (П.1) в (П.2) и определим I_{np} :

$$I_{np} = I_0 - \frac{I_0 \cdot \alpha \cdot dS}{S}. \quad (\text{П.3})$$

Вынесем I_0 за скобки и получим:

$$I_{np} = I_0 \left(1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S} \right). \quad (\text{П.4})$$

Далее правую и левую часть разделим на I_0 :

$$\frac{I_{np}}{I_0} = 1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S}. \quad (\text{П.5})$$

Так как $\frac{I_{np}}{I_0} = T$, где T – коэффициент пропускания, выражение (П.5) запишем в виде:

$$T = 1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S}. \quad (\text{П.6})$$

Аналогично, если в кювете находится не одна, а монослой из n клеток, получим:

$$\frac{I_{np}}{I_0} = 1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \quad (\text{П.7})$$

Выражение (П.7) получено для монослоя клеток микроводорослей. В реальных условиях для разбавленных культур микроводорослей, в которых клетки не затеняют друг друга, величина коэффициента пропускания будет также определяться согласно (П.7). В (П.7) отношение числа клеток к площади поверхности кюветы называется поверхностной концентрацией. Помножив числитель и знаменатель на длину кюветы l , получим зависимость пропускания от биомассы:

$$T = 1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot l \cdot dS}{S \cdot l}, \quad (\text{П.8})$$

$$T = 1 - \alpha \cdot B \cdot l \cdot dS. \quad (\text{П.9})$$

Так как α , l , dS постоянные величины (при условии неизменности размеров клеток), то обозначим их произведение некой константой k . Следовательно, выражение (П.9) примет вид:

$$T = 1 - k \cdot B. \quad (\text{П.10})$$

Последнее выражение аналогично закону Бугера-Ламберта-Бера для малых концентраций клеток. Учитывая, что:

$$D = -\lg(T), \quad (\text{П.11})$$

$$T = 10^{-D} = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot B},$$

при малых значениях биомассы можно разложить последнее выражение в ряд Тейлора в окрестностях нуля:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot B} \cong 1 - \varepsilon \cdot l \cdot B + \frac{1}{2} \varepsilon \cdot l \cdot B^2 - \dots$$

Ограничившись только первым членом последовательности, получим линейное уменьшение пропускания с ростом плотности культуры (П.10). На рисунке П.2 представлено описание экспериментальных данных зависимости пропускания от биомассы спирулины при малых значениях биомассы.

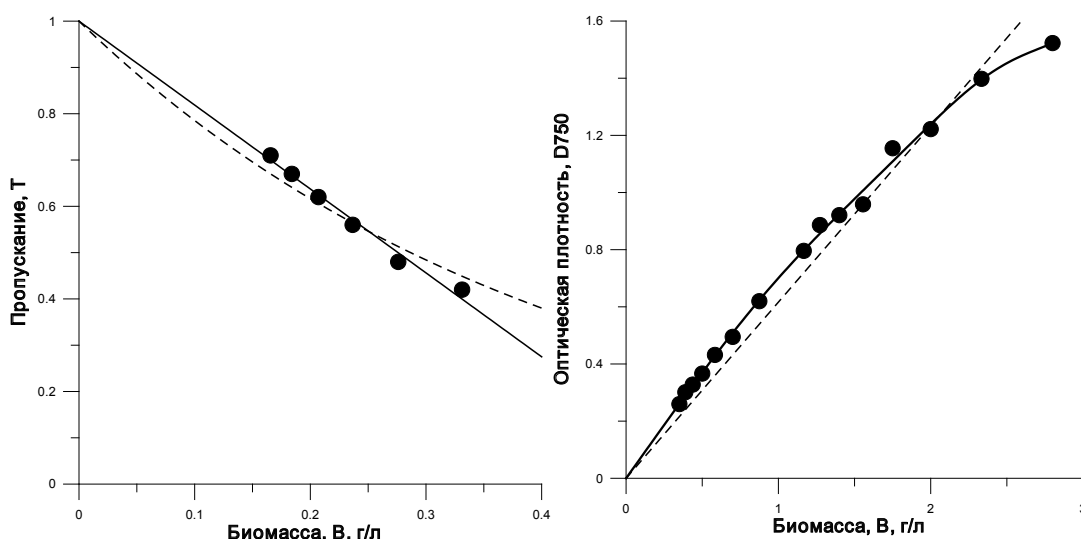


Рисунок П.2. Зависимость пропускания и оптической плотности культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (П.10) и (П.21) соответственно. Пунктирная линия – расчёт по уравнению Бугера-Ламберта-Бера
Figure П.2. The dependence of the transmittance and optical density of culture *A. platensis* from its biomass. Line – approximation of experimental data by the equation (П.10) (П.21), respectively. Dotted line – calculation according to the equation Bouguer-Lambert-Ber

Если в кювете находится более одного слоя клеток микроводорослей, то поглощенная энергия второго слоя будет определяться долей проходящей энергии первого слоя. Получим выражение для нахождения оптической плотности и коэффициента пропускания для нескольких слоев. Согласно (П.4) и (П.7), проходящая энергия для первого слоя:

$$I_{np1} = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \right). \quad (\text{П.12})$$

Учитывая, что клетки в кювете распределены равномерно, запишем выражение для поглощенной энергии вторым слоем:

$$I_{n2} = \frac{I_{np1} \cdot \alpha \cdot n \cdot dS}{S}. \quad (\text{П.13})$$

Интенсивность проходящего света через второй слой будет иметь вид:

$$I_{np2} = I_{np1} - I_{n2}. \quad (\text{П.14})$$

В выражение (П.14) подставим (П.12) и получим:

$$I_{np2} = I_{np1} \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right) = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^2. \quad (\text{П.15})$$

Соотношение (П.15) дает возможность определить интенсивность прошедшего света через второй слой. Очевидно, что для третьего слоя мы получим выражение аналогичное (П.15), только в третьей степени. Для k слоев это выражение будет выглядеть так:

$$I_{npk} = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (\text{П.16})$$

Чтобы найти коэффициент пропускания T , левую и правую часть разделим на I_0 :

$$\frac{I_{npk}}{I_0} = T = \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (\text{П.17})$$

Как и в предыдущем случае, перейдем от поверхностной к объёмной концентрации клеток, помножив левую и правую часть уравнения на длину кюветы:

$$T = \left(1 - \frac{\alpha \cdot B \cdot l \cdot dS}{k}\right)^k. \quad (\text{П.18})$$

Так как α , l , dS постоянные величины, то обозначим их некоторой константой j . Следовательно, выражение примет вид:

$$T = (1 - j \cdot B)^k. \quad (\text{П.19})$$

Предложенный подход позволяет объяснить то, что для культур микроводорослей линейная зависимость между оптической плотностью и биомассой микроводорослей не всегда выполняется. Взаимосвязь величины оптической плотности, которую показывает любой оптический прибор, с биомассой микроводорослей можно записать следующим образом:

$$D = -\lg T.$$

Подставляя (П.19) в последнее уравнение, получим нелинейную зависимость между величиной оптической плотности и биомассой микроводорослей:

$$D = -\lg(1 - j \cdot B)^k. \quad (\text{П.20})$$

Для упрощения обработки экспериментальных данных, разложим (П.19) в ряд Тейлора при малых значениях биомассы, и подставим в (П.20):

$$D = -\lg(1 - j \cdot k \cdot B + \frac{1}{2} \cdot j^2 \cdot k \cdot (k-1) \cdot B^2 - \frac{1}{6} \cdot j^3 \cdot k \cdot (k-1) \cdot (k-2) \cdot B^3 + \dots).$$

Вводя обобщенные коэффициенты, окончательно получим:

$$D \cong -\lg(1 - a \cdot B + b \cdot B^2 - c \cdot B^3).$$

(П.21)

На рисунке П.2 представлена аппроксимация зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей уравнением (П.21). Отметим, что предложенная модель с заданной степенью точности описывает отклонения от линейного закона зависимости оптической плотности культуры микроводорослей от ее биомассы. Уравнение (П.19) является довольно упрощённым, так как не учитывает изменение размеров и содержания биохимических компонентов клеток микроводорослей в процессе роста культуры. Тем не менее, предложенный подход позволяет с достаточно высокой точностью описывать зависимость пропускания и оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей.

ЛИТЕРАТУРА

- Абросов Н. С., Ковров Б. Г., Черепанов О. А. Экологические механизмы сосуществования и видовой регуляции. – Новосибирск: Наука, 1982. – 302 с.
- Авсиян А. Л. Динамика потери биомассы в культуре *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanoprokaryota) в темновых условиях // Альгология. – 2014. – **24**, 3. – С. 417 – 420
- Барашков Г. К. Сравнительная биохимия водорослей. – М.: Пищ. пром., 1972. – 303 с.
- Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. – М.: Мир, 1989. – 692 с.
- Белянин В. Н. Светозависимый рост низших фототрофов (в управляемых условиях). – Новосибирск: Наука, 1984. – 96 с.
- Белянин В. Н., Сидько Ф. Я., Тренкениу А. П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. – 1980. – Новосибирск: Наука. – 136 с.
- Белянин В. Н., Тренкениу Р. П., Силкин В. А. Рост водоросли *Platymonas viridis* в опытах по оптимизации микроэлементного состава среды // Биология моря. – 1979. – **4**. – С. 14 – 19.
- Белянин В. Н., Ковров Б. Г. К математической модели биосинтеза в светолIMITИРОВАННОЙ культуре микроводорослей // ДАН СССР. – 1968. – **179**, 6. – С. 1463 – 1466.
- Биологический энциклопедический словарь. – М.: Сов. Энциклопедия, 1986. – 864 с.
- Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: автореф. дис. канд. биол. наук. – Севастополь, 2008. – 28 с.
- Вальтер Р., Лампрехт И. Современные теории и уравнения роста / Термодинамика биологических процессов. – М.: Наука, 1976. – С. 98 – 112.
- Геворгиз Р. Г., Алисиевич А. В., Шматок М. Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры // Экология моря. – 2005. – **70**. – С. 96 – 106.
- Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б. Динамика биомассы *Dunaliella salina* в условиях непрерывного культивирования // Экология моря. – 2005. – **67**. – С. 35 – 37.
- Геворгиз Р. Г., Лелеков А. С. Применение простейших моделей для описания накопительных кривых // Экология моря. – 2005. – **67**. – С. 38 – 43.
- Геворгиз Р. Г., Лелеков А. С., Король О. Н. Моделирование динамики роста популяции микроорганизмов в накопительной культуре. Закрытая система // Рыбное хозяйство Украины. – 2013. – **5**. – С. 6 – 15.
- Геворгиз Р. Г., Тренкениу Р. П. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Стационарный процесс // Альгология. – 1998. – **8**, 3. – С. 273 – 277.

- Герасин С. Н., Козлов М. А. Оценка параметров численности популяции в дискретной модели Рикера // Бионика Интеллекта. – 2008. – 2, 69. – С. 159 – 163.
- Гудвилович И. Н., Лелеков А. С. Влияние различных концентраций минерального азота в среде на содержание В-фикоэритрина в клетках *Porphyridium cruentum* Nag. // Экология моря. – 2008. – 76. – С. 45 – 48.
- Гуревич Ю. Л. Устойчивость и регуляция размножения в микробных популяциях. – Новосибирск: Наука, 1984. – 161 с.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1. – М.: Мир, 1982. – 392 с.
- Добрынина В. И., Свешникова Е. А. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Медгиз, 1958. – 165 с.
- Дробецкая И. В. Влияние условий минерального питания на рост и химический состав *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. : дис. канд. биол. наук. – Севастополь, 2005. – 188 с.
- Дробецкая И. В., Минюк Г. С., Тренкеншу Р. П. и др. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях минерального питания // Экология моря. – 2001. – 56. – С. 41 – 46.
- Заика В. Е. Влияние температуры на скорость роста пойкилотермных животных (модель) / Круговорот вещества и энергии в озёрах и водохранилищах. – Листвеиничное-на-Байкале, 1973. – С. 196 – 199.
- Зитте П., Вайлер Э. В., Кадерайт Й. В. и др. Ботаника. Том 2. Физиология растений. – М.: Академия, 2008. – 496 с.
- Зотин А. И. Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения. – М.: Наука, 1974. – 184 с.
- Ковров Б. Г. Распределение концентраций веществ в околоклеточной среде / Управляемый биосинтез. – М.: Наука, 1966. – 172 с.
- Ковров Б. Г., Буданов А. С. Малый лабораторный культиватор для интенсивного выращивания хлореллы в управляемых условиях среды // Управляемое культивирование микроводорослей. – М.: Наука. – 1964. – С. 8 – 12.
- Кокова В. Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных. – Новосибирск: Наука, 1982. – 168 с.
- Количественные аспекты роста организмов. – М.: Наука, 1975. – 292 с.
- Конев С. В., Волотовский И. Д. Фотобиология. – Минск: Изд-во БГУ, 1979. – 383 с.
- Константинов А. С. Общая гидробиология: Учеб. для студентов биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1986. – 472 с. (4-е изд., перераб. и доп.).
- Ладыгина Л. В. Микроводоросли как кормовые объекты личинок мидий и устриц: автореф. дис. канд. биол. наук. – Севастополь, 2007. – 25 с.
- Левич А. П. Потребности фитопланктона в ресурсах среды и пути управления структурой альгоценозов // Журн. общ. биол. – 1989. – 50, 3. – С. 316 – 328.
- Левич А. П. Управление структурой фитопланктонных сообществ (эксперимент и моделирование): дис. докт. биол. наук. – М., 2000. – 386 с.

- Лежнев Э. И., Пакратов В. П., Кошевой Ю. В. Управляемое культивирование клеток. – М.: Наука, 1974. – 92 с.
- Лелеков А. С., Геворгиз Р. Г. Динамика плотности культуры микроводорослей в стационарной фазе роста // Бюлетень ГНБС. – 2013. – **108**. – С. 39 – 44.
- Лелеков А. С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре: автореф. дис. канд. биол. наук. – Севастополь, 2009. – 24 с.
- Логофет Д. О., Белова И. Н. Неотрицательные матрицы как инструмент моделирования динамики популяций: классические модели и современные обобщения // Фундаментальная и прикладная математика. – 2007. – **13**, 4. – С. 145 – 164.
- Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Тренкениу Р. П. и др. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* при различных условиях азотного питания // Экология моря. – 2002. – **62**. – С. 61 – 66.
- Мокроносов А. Т., Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. – М: Академия, 2006. – 448 с.
- Одум Ю. Экология. Т. 1. – М.: Мир., 1986. – 328 с.
- Паламодова О. С. Динамика фотоадаптации некоторых видов диатомовых водорослей // Экология моря. – 2009. – **78**. – С. 70 – 74.
- Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 330 с.
- Печуркин Н. С., Терсков И. А. Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях). – Новосибирск: Наука, 1975. – 216 с.
- Прокофьев Е. А., Зотина Р. С., Зотин А. И. Феноменологические уравнения роста и их использование для определения максимальной продолжительности жизни / Математическая биология развития. – М.: Наука, 1982. – 255 с.
- Рабинович Е. Фотосинтез. – М.: ИЛ., 1951. – Т. 1. – 648 с.
- Работнова И. Л. Некоторые данные о закономерностях роста микроорганизмов // Журн. Общ. Биол. – 1972. – **33**, 5. – С. 539 – 554.
- Ризниченко Г. Ю. Математические модели в биофизике и экологии. – М.: Иж.: ИКИ, 2003. – 184 с.
- Ризниченко Г. Ю., Рубин. А. Б. Математические модели биологических продукционных процессов. – М.: Мир, 1993. – 301 с.
- Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическое моделирование в биофизике. – М.: Наука, 1975. – 344 С.
- Рубин А. Б., Кренделева Т. Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза // Успехи биологической химии – 2003. – **43**. – С. 225 – 266.
- Рубин А. Б. Биофизика в 2-х тт. – М.: Мир, 2002. – 448 с.
- Сидько Ф. Я., Ерошин Н. С. Определение концентрации пигментов и числа клеток во взвеси водорослей на фотоэлектроколориметре ФЭКН-57 / Управляемое культивирование микроводорослей. – М.: Наука, 1964. – С. 38 – 42.

- Скалецкая Е. И., Фрисман Е. Я., Шапиро А. П. Дискретные модели динамики численности популяций и оптимизация промысла. – М.: Наука, 1979. – 166 с.
- Соловченко А. Е. Экранирование видимого и УФ излучения как фотозащитный механизм растений: автореф. дис. докт. биол. наук. – М., 2009. – 47 с.
- Терсков И. А., Гительзон И. И., Сидько Ф. Я. и др. Интенсивное непрерывное культивирование хлореллы в плотностном режиме при различной освещенности / Управляемое культивирование микроводорослей. – М.: Наука, 1964. – С. 55–84.
- Тренкениу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: дис. канд. биол. наук. – Красноярск, 1984. – 170 с.
- Тренкениу Р. П. Влияние организации «узкого места» метаболизма на кинетику ферментативного превращения субстрата // Молекуляр. биол. – 1988. – 22, 6. – С. 1464 – 1472.
- Тренкениу Р. П., Вопилова Л. В. Описание мгновенных световых кривых фотосинтеза // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. – 1989. – 3. – С. 93 – 99.
- Тренкениу Р. П. Кинетика субстратзависимых реакций при различной организации метаболических систем. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. – 89 с.
- Уильямсон М. Анализ биологических популяций. – М.: Мир, 1975. – 272 с.
- Финенко З. З., Ланская Л. А. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объёмах воды / Экологическая физиология морских планктонных водорослей. – К.: Наук. думка, 1971. – С. 22 – 50.
- Фуряев Е. А. Микроспектрофотометрические характеристики клеток водорослей в различных условиях культивирования: автореф. дис. канд. биол. наук. – Красноярск, 1979. – 23 с.
- Хол Д., Рао К. Фотосинтез. – М.: Мир, 1983. – 134 с.
- Чернавский Д. С., Иерусалимский Н. Д. К вопросу об определяющем звене в системе ферментативных реакций // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1965. – 5. – С. 665 – 672.
- Чиков В. И. Фотосинтез и транспорт ассимилятов. – М.: Наука, 1987. – 188 с.
- Шапиро А. П., Луппов С. П. Рекуррентные уравнения в теории популяционной биологии. – М.: Наука, 1983. – 134 с.
- Ширяев А. В. Моделирование накопительной кривой роста микроводорослей с учётом темнового дыхания и возврата субстрата в биосинтетические процессы / Понт Эвксинский 5: Междунар. науч.-практ. конф., 24 – 27 сентября 2007 г.: тезисы докл. – Севастополь, 2007. – С. 117 – 118.
- Штоль А. А., Мельников Е. С., Ковров Б. Г. Расчёт и конструирование культиваторов для одноклеточных водорослей. – Красноярск: Красноярское книжное изд-во, 1976. – 96 с.

- Anderson P. A.* Automatic recording of the growth rates of continuously cultured microorganisms // *J. of General Physiol.* – 1953. – **36**. – P. 733 – 739.
- Baly E. C. C.* The kinetics of photosynthesis // *Proc. R. Soc. Lond.* – 1935. – **117**. – P. 218 – 239.
- Bannister T. T.* Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation // *Limnol. Oceanogr.* – 1979. – **24**, 1. – P. 76 – 96.
- Beadle G., Tatum E.* Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1941. – V.27. – P. 499 – 506.
- Bell G. I., Anderson E. C.* Cell growth and division. I. A mathematical model with applications to cell volume distributions in mammalian suspension cultures // *Biophys. J.* – 1967. – **7**. – P. 329 – 351.
- Bell G. I., Anderson E. C.* Cell growth and division. II. Experimental studies of cell volume distributions in mammalian suspension cultures // *Biophys. J.* – 1967. – **7**. – P. 353 – 364.
- Bergter F.* Wachstum von Mikroorganismen. Experimente und Modelle. / VEB Gustav Fischer. –Verlag, 1983. – 549 p.
- Blackman F. F.* Optima and limiting factors // *Ann. Bot. Lond.* – 1905. – **19**. – P. 281 – 295.
- Blackman V. N.* The Compound Interest Law and Plant Growth // *Ann. Bot. Lond.* – 1919. – **33**, 3. – P. 353 – 360.
- Brown A. H., Webster G. C.* The influence of light on the rate of respiration of the blue-green alga *Anabaena* // *Amer. J. Bot.* – 1953. – **40**, 10. – P. 753 – 758.
- Bryson V.* Microbial selection. The turbidostatic selector – a device for automatic isolation of bacterial variants // *Science*. – 1952. – **117**. – P. 48 – 52.
- Chen Y., Vaidyanathan S.* A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – **724**. – P. 67 – 72.
- Cloern J. E., Grenz C., Vidregar-Lucas L.* An empirical model of the phytoplankton chlorophyll:carbon ratio – the conversation between productivity and growth // *Limnol. Oceanogr.* – 1995. – **40**, 7. – P. 1310 – 1321.
- Collins J. F., Richmond M. H.* Rate of growth of *Bacillus cereus* between divisions // *J. Gen. Microbiol.* 1962. – **28**. – P. 15 – 33.
- Collos Y.; Mornet F.; Sciandra A. et al.* An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures // *J. Appl. Phycol.* – 1999. – **11**. – P. 179 – 184.
- Cuhel R. L.* Night synthesis of protein by algae // *Limnol. Oceanogr.* – 1984. – **29**, 4. – P. 731 – 744.
- Droop M. R.* Vitamin B_{12} and marine ecology. V. Continuous culture as an approach to nutritional kinetics // *Helgolander wiss. Meeresunters.* – 1970. – **20**. – P. 629 – 636.
- Fabregas J., Garcia D., Morales E.* Renewal rate of semicontinuous culture of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharoide and fatty acid productivity// *J. Ferment. Bioengin.* – 1998. – **86**, 5. – P. 463 – 467.
- Finenko Z. Z., Hoepffner N., Williams R. et al.* Phytoplankton carbon to chlorophyll a ratio: response to light, temperature and nutrient limitation // *Морск. экол. журн.* – 2003. – **2**, 2. – С. 40 – 64.

- Flynn K. J.* Do we need complex mechanistic photoacclimation models for phytoplankton? // *Limn. Ocean.* – 2003. – **48**, 6. – P. 2243 – 2249.
- Fresnedo O., Serra J. L.* Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae) // *J. Phycol.* – 1992. – **28**. – P. 786 – 793.
- Galloway R. A., Rolle I., Soeder C. J.* CO₂ fixation and biosynthetic activity of darkened synchronous *Chlorella fusca* // *Arch. Hydrobiol.* – 1974. – **73**. – P. 1 – 13.
- Gatenby C. M., Orcutt D. M., Kreeger D. A. et al.* Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels // *J. of Appl. Phycol.* – 2003. – **15**. – P. 1 – 11.
- Geider R. J., MacIntyre H. L., Kana T. M.* A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* – 1996. – **41**, 1. – P. 1 – 15.
- Geider R. J., MacIntyre H. L., Kana T. M.* A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrient and temperature // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1997. – **148**. – P. 187 – 200.
- Geider R. J., Osborne B. A.* Respiration and microalgal growth: a review of quantitative relationship between dark respiration and growth // *New phytol.* – 1989. – **112**. – P. 327 – 341.
- Grobbelaar J. U., Soeder C. J.* Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds // *Plankt. Res.* – 1985. – **7**, 4. – P. 497 – 506.
- Handa N.* Carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum* // *Mar. Biol.* – 1969. – **4**. – P. 208 – 214.
- Hu Q., Guterman H., Richmond A.* Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities // *J. Phycol.* – 1996. – **32**. – P. 1066 – 1073.
- Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S. et al.* Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum* // *Biotech. and Bioengin.* – 2006. – **96**. – P. 456 – 463.
- Ketchum B.H., Redfield A.C.* A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture // *Biol. Bull.* – 1938. – **75**. – P. 165 – 169.
- Koch A. L., Schaechter M.* A model for statistics of the cell division process // *J. gen. Microbiol.* 1962. – **29**. – P. 435 – 454.
- Krasnovsky A. A.* Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies // *Membr. Cell Biol.* – 1998. – **12**, 5. – P. 665 – 690.
- Kubitschek H. E.* Growth during the bacterial cell cycle: analysis of cell size distribution // *Biophys. J.*, 1969. – **9**. – P. 792 – 809.
- Laws E. A., Chalup M. S.* A microalgal growth model // *Limnol. Oceanogr.* – 1990. – **35**, 3. – P. 597 – 608.
- Liebig J.* Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology. – London: Taylor and Walton, 1847. – 320 p.
- Macintyre, H. L., Kana T. M., Anning T., Geider R. J.* Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria // *J. Phycol.* – 2002. – **38**. – P. 17 – 38.
- Markager S., Jespersen A.-M., Madsen T. V. et al.* Diel changes in dark respiration in a plankton community // *Hydrobiologia.* – 1992. – **238**, 1. – P. 119 – 130.

- Markager S., Sand-Jensen K. Patterns of night-time respiration in a dense phytoplankton community under a natural light regime // J. Ecol. – 1989. – **77**. – P. 49 – 61.
- Michaelis L., Menten M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung // Biochem. J. – 1913. – **49**. – P. 333 – 343.
- Monod J. The growth of bacterial cultures // Ann. Rev. Microbiol. – 1949. – **3**. – P. 371 – 394.
- Monod J. La technique de culture continue. Theorie et applications // Ann. Inst. Pasteur. – 1950. – **79**. – P. 390 – 410.
- Morris I., Glover H. E., Yentsch C. S. Products of photosynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis // Mar. Biol. – 1974. – **27**, 1. – P. 1 – 9.
- Murray J. D. Mathematical Biology: I. An Introduction (Interdisciplinary Applied Mathematics). – 2002, Berlin. – 576 p.
- Northrop I. H. Apparatus for maintaining bacterial cultures in the steady state. // J. General Physiol. – 1954. – **38**. – P. 105 – 110.
- Novick A., Szilard L. Description of the chemostat. // Science. – 1950. – **112**. – P. 715 – 718.
- Pearl R., Reed L. J. On the Mathematical Theory of Population Growth // Metron. – 1923. – **3**, 1. – P. 6 – 19.
- Qiang H., Guterman H., Richmond A. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities // J. Phycol. – 1996. – **32**. – P. 1066 – 1073.
- Raven J. A., Beardall J. Respiration in aquatic photolithotrophs / Respiration in aquatic ecosystems. – Oxford: Oxford Univ. Press, 2005. – P. 36 – 46.
- Richmond A. E. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. // Hydrobiologia. – 2004. – **512**. – P. 33 – 37.
- Torzilla G., Sacchi A., Materassi R. et al. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors // J. Appl. Phycol. – 1991. – **3**. – P. 103 – 109.
- Torzilla G., Faraloni C., Silva A. et al. Photoacclimation of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds // Eur. J. Phycol. – 2012. – **47**, 2. – P. 169 – 181.
- Tyson J. J., Hannsgen K. B. Cell growth and division: a deterministic/probabilistic model of the cell cycle // J. Math. Biology, 1986. – **23**. – P. 231 – 246.
- Verhulst P. F. Recherches Mathématiques sur La Loi D'Accroissement de la Population // Nouveaux Mémoires de l'Académie Royale des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles. – 1845. – **18**, 1. – P. 1 – 45.
- Williams F. M. Dynamics of microbial populations / Patten B. C. Systems Analysis and Simulation in Ecology. – New York and London, Academic Press, 1971. – **1**. – P. 197 – 267.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ

МОНОГРАФИЯ

Рудольф Павлович Тренкеншу,
заведующий отделом биотехнологий и фиторесурсов.
Лелеков Александр Сергеевич,
старший научный сотрудник отдела биотехнологий и фиторесурсов.

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского,
299011, пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, Россия.
E-mail: trenkens@yandex.ru, a.lelekov@yandex.ru



КОНСТАНТА

Подписано в печать 15.09.2017. Формат 70x100/16. Объем 9.5 п. л. Гарнитура Times.
Печать офсетная. Бумага офсетная 80 г/м². Тираж 300 экз. Заказ № 45745

Отпечатано в типографии ООО «КОНСТАНТА»
308519, Белгородская обл., Белгородский р-н, пос. Северный, ул. Березовая, 1/12.
Тел./факс (4722) 300-720, www.konstanta-print.ru